

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie
Max Rubner-Institut
Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel

Neue Ansätze zur Reduktion der Phagenbelastung von Molke

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
M.Sc. Natalia Wagner
aus Gremutschaja Pad

Kiel, 2017

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie
Max Rubner-Institut
Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel

Neue Ansätze zur Reduktion der Phagenbelastung von Molke

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
M.Sc. Natalia Wagner
aus Gremutschaja Pad

Kiel, 2017

Dekan: Prof. Dr. Joachim Krieter
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Knut J. Heller
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Karin Schwarz
Tag der mündlichen Prüfung: 08.11.2017

„Gedruckt mit Genehmigung der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel“

Für meine Familie

Eidesstattliche Erklärungen:

M.Sc. Natalia Wagner

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel „Neue Ansätze zur Reduktion der Phagenbelastung von Molke“ selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und dass ich die Arbeit noch keinem anderen Fachbereich bzw. noch keiner anderen Fakultät vorgelegt habe.

Kiel, den.....

Natalia Wagner

Hiermit erkläre ich, dass gegen mich kein strafrechtliches Ermittlungsverfahren schwebt.

Kiel, den.....

Natalia Wagner

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation nach den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis (Standard wissenschaftlichen Arbeitens nach den Empfehlungen der DFG) abgefasst wurde.

Kiel, den.....

Natalia Wagner

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1

Allgemeine Einleitung-----	1
1.1 Milchsäurebakterien-----	2
1.2 Bakteriophagen-----	4
1.3 Bakteriophagen der Milchsäurebakterien-----	8
1.3.1 <i>L. lactis</i> Phagen-----	8
1.3.2 <i>S. thermophilus</i> Phagen-----	9
1.3.3 <i>Ln. pseudo-/mesenteroides</i> Phagen-----	10
1.4 Bakteriophagen in der Milchwirtschaft-----	11
1.5 Zielsetzung der Arbeit-----	13

Kapitel 2

Charakterisierung und thermische Inaktivierung der aus Molkenpulver isolierten Bakteriophagen der Milchsäurebakterien-----	14
2.1 Einleitung-----	15
2.2 Material und Methoden-----	17
2.2.1 Bakterienstämme und Bakteriophagen-----	17
2.2.2 Enzyme und Primer-----	18
2.2.3 Nährmedien, Lösungen und Puffer-----	18
2.2.3.1 Allgemeine Lösungen und Puffer-----	19
2.2.3.2 Nährmedien für <i>L. lactis</i> -----	20
2.2.3.3 Nährmedien für <i>Leuconostoc</i> -----	21
2.2.3.4 Nährmedien für <i>S. thermophilus</i> -----	22
2.2.4 Kultivierung der Stämme-----	22
2.2.5 Langzeitlagerung der Stämme-----	23
2.2.6 Phagennachweis und Titerbestimmung-----	23
2.2.6.1 Aufarbeitung der Proben-----	23
2.2.6.2 Spotttest-----	23
2.2.6.3 Plaquetest-----	24
2.2.7 Phagenanzucht-----	24
2.2.8 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) der Phagen-----	25
2.2.9 Phagen-DNA-Isolierung aus Bakterienrasen mit konfluenter Lyse-----	25
2.2.10 Restriktionshydrolyse der DNA-----	26
2.2.11 Agarose-Gelelektrophorese-----	26
2.2.12 Thermische Inaktivierung der Phagen-----	27
2.3 Ergebnisse-----	28
2.3.1 Isolierung und Charakterisierung der Bakteriophagen-----	28
2.3.2 Screening auf die Hitzestabilität der Phagen-----	33
2.3.3 Inaktivierungskinetik der thermostabilen Bakteriophagen-----	36

2.3.4	Restriktionshydrolyse der thermostabilsten Phagen	37
2.3.5	Langzeitlagerung der <i>L. lactis</i> Phagen	38
2.4	Diskussion	39
2.5	Schlussfolgerungen	41

Kapitel 3

Thermische Stabilität von <i>L. lactis</i> Bakteriophagen in Rohmilch bei Erhitzung in einer Pilot-Pasteurierungsanlage		42
3.1	Einleitung	43
3.2	Material und Methoden	44
3.2.1	Bakteriophagen und Bakterienstämme	44
3.2.2	Phagenanreicherung für den Cäsiumchlorid-Gradienten	45
3.2.3	Cäsiumchlorid-Gradient	46
3.2.4	Pilot-Pasteurierungsanlage	47
3.2.5	Versuchsaufbau	49
3.2.6	Berechnung der Inaktivierungsparameter (<i>D</i> - & <i>z</i> -Werte)	49
3.3	Ergebnisse	51
3.3.1	Kinetik der Phageninaktivierung	51
3.3.2	Bestimmung der Inaktivierungsparameter (<i>D</i> - & <i>z</i> -Werte)	55
3.4	Diskussion	58
3.5	Schlussfolgerungen	60

Kapitel 4

Minimierung der Phagenbelastung in Molke und Molkenprodukten durch Membranfiltration		61
4.1	Einleitung	62
4.2	Material und Methoden	64
4.2.1	Bakterienstämme und Bakteriophagen	64
4.2.2	Aufarbeitung der Bakteriophagen über den CsCl-Gradienten	64
4.2.3	Transmissionselektronenmikroskopie der Bakteriophagen	64
4.2.4	Zur Filtration eingesetzte Molke	65
4.2.5	Membranen	65
4.2.6	Rasterelektronenmikroskopie der Membranen	65
4.2.7	Experimenteller Aufbau der Labormembrananlage	66
4.2.8	Agarosegel-Elektrophorese	67
4.2.9	Adsorptionsmessungen der Phagen an inaktivierte Bakterien	67
4.3	Ergebnisse	68
4.3.1	Elektronenmikroskopische Charakterisierung der Membranen vor der Filtration	68
4.3.2	Auswahl der Modellphagen	69
4.3.3	Überprüfung der Lagerstabilität der Modellphagen	70
4.3.4	Effekt der Membranporengröße auf die Phagenretention und Molkenproteinpermeation	72

4.3.5	Einfluss der Phagenmorphologie auf den Phagenrückhalt während der Filtration ---	73
4.3.6	Elektronenmikroskopische Charakterisierung der Membranen nach der Filtration --	74
4.3.7	Einsatz der Bakterien als Adsorbens und Deckschichtbildner -----	75
4.3.7.1	Adsorption der Bakteriophagen an thermisch inaktivierte Bakterien -----	75
4.3.7.2	Adsorption der Bakteriophagen an mechanisch inaktivierte Bakterien -----	77
4.3.7.3	Elektronenmikroskopie der Phagenadsorption an thermisch und mechanisch inaktivierte Bakterien -----	77
4.3.7.4	Filtration unter Einsatz der Bakterien als Adsorbens und Deckschichtbildner ----	79
4.3.8	Bestimmung der Oberflächenladung der Phagen -----	80
4.4	Diskussion -----	82
4.5	Schlussfolgerungen -----	85
 Kapitel 5		
Einfluss einer Phageninfektion auf das Metabolom von Milchprodukten nach Fermentation mit einer <i>Leuconostoc</i> -Aromakultur -----		86
5.1	Einleitung -----	87
5.2	Material und Methoden -----	88
5.2.1	Herstellung der fermentierten Milchprodukte -----	88
5.2.2	Bestimmung der Lebendkeimzahl und der Phagentiter -----	89
5.2.3	Elektronische Nase -----	90
5.2.4	Versuchsaufbau -----	91
5.2.5	Sensorische Prüfung – Dreieckstest -----	92
5.3	Ergebnisse -----	92
5.3.1	Einfluss einer <i>Leuconostoc</i> Phageninfektion auf die Aromaentwicklung in Sauermilch -----	92
5.3.2	Einfluss einer <i>Leuconostoc</i> Phageninfektion auf die Aromaentwicklung im Käse ----	96
5.3.2.1	Mikrobiologische Untersuchung -----	97
5.3.2.2	Sensorische Untersuchung – Elektronische Nase -----	98
5.3.2.3	Sensorische Untersuchung – Dreieckstest -----	99
5.4	Diskussion -----	100
5.5	Schlussfolgerungen -----	102
Zusammenfassung -----		104
Summary -----		106
Literaturverzeichnis -----		108
Abbildungsverzeichnis -----		125
Tabellenverzeichnis -----		127
Anhang -----		128
Danksagung -----		131
Lebenslauf -----		132
Veröffentlichungen -----		133

Abkürzungsverzeichnis

α -LA	α -Lactalbumin
β -LG	β -Lactoglobulin
δ	Dichte
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
%	Prozent
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
ad	Lat.: zu, auf etwas hin
BLE	Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung
bzw.	beziehungsweise
ca.	<i>circa</i>
CaCl_2	Calciumchlorid
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CsCl	Cäsiumchlorid
D-Wert	Dezimale Reduktionszeit
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EDTA	Ethylendiamintetra-Acetat
EMA	European Medicines Agency
engl.	englisch
et al.	<i>et alteri</i> (und andere)
etc.	<i>et cetera</i>
g	Gramm
h	Stunde/n (engl.: <i>hour/s</i>)
HCl	Chlorwasserstoff
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert
kV	Beschleunigungsspannung in Kilovolt
/	Liter
L.	<i>Lactococcus</i>
Ln.	<i>Leuconostoc</i>
m	Meter
M	Mol [mol/l]
MF	Molkenpulverformulierung
min	Minute/n
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar (mmol/l)

MP	Molkenpulver
MPa	Megapascal
mod.	modifiziert
MOI	engl.: <i>multiplicity of infection</i>
n	Anzahl
N	Mikrobielle Population
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD _{620 nm}	Optische Dichte bei 620 nm
PbE	Plaque-bildende Einheiten
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
PES	Polyethersulfon
pH	pH-Wert
PPA	Pilot-Pasteurierungsanlage
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rH ₂ O	zweifach entionisiertes und demineralisiertes Reinstwasser
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen / Minute (engl.: <i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde/n
S.	<i>Streptococcus</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SM-Puffer	Saline-Magnesium-Puffer
ssp.	Subspezies
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (engl.: <i>tris buffered saline</i>)
TE	Tris-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Einheit für enzymatische Aktivität (engl.: <i>unit</i>)
UHT	Ultra-High Temperature (deu: ultrahocherhitzt)
UF-Membran	Ultrafiltrationsmembran
verd.	Verdünnt
V	Volumen
z.B.	zum Beispiel
z-Wert	Abhängigkeit der logarithmierten <i>D</i> -Werte von der Temperatur

Kapitel 1

Allgemeine Einleitung

1.1 Milchsäurebakterien

Milch und Milchprodukte gehören mit einem jährlichen Verbrauch von knapp 128 kg pro Kopf zu den wichtigsten Lebensmitteln in Deutschland (BLE, 2016). Neben der Milch in flüssiger Form zählen hauptsächlich Käse, Joghurt, Butter, sowie Sauermilcherzeugnisse zu den meist konsumierten Milchprodukten (BLE, 2016). Bei der Herstellung dieser fermentierten Lebensmittel spielen Milchsäurebakterien eine entscheidende Rolle (Daly et al., 1996; McKay & Baldwin, 1990), denn sie bewirken nicht nur die Dicklegung der Milch durch die Gerinnung des Milcheiweißes Casein, sondern sie unterdrücken auch das Wachstum unerwünschter Bakterien durch die Absenkung des pH-Werts und machen die Milchprodukte so länger haltbar (Riemelt et al., 2007). Diese Eigenschaften der Milchsäurebakterien sind auf einen Stoffwechselprozess zurückzuführen, bei dem verschiedene Monosaccharide zu Milchsäure als einzigem oder hauptsächlichem Endprodukt vergärt werden. Anhand der gebildeten Gärungsendprodukte wird die Unterscheidung zwischen den homofermentativen und heterofermentativen Milchsäurebakterien vorgenommen (Holzapfel & Wood, 2012). Die homofermentativen Bakterien bauen Glucose zusammen mit anderen Hexosen über die Glykolyse ab und bilden zu fast 90 % reines Lactat. Bei den heterofermentativen Bakterien werden neben Lactat zusätzlich Acetat, Ethanol und CO₂ gebildet. Dies ist dem Fehlen der Aldolase, einem Schlüsselenzym der Glykolyse geschuldet, wodurch einige Zucker über den Pentose-Phosphat-Weg abgebaut werden müssen (Madigan & Martinko, 2009; Riemelt et al., 2007).

Taxonomisch gehören die Milchsäurebakterien der Ordnung *Lactobacillales* (Lahtinen, 2012; Autenrieth et al., 2009) an und kommen in Form von unbeweglichen Stäbchen oder Kokken vor (Mahony & van Sinderen, 2014). Die Bakterien sind Gram-positiv, Katalase-negativ, säuretolerant und bilden keine Sporen. Bedingt durch das Fehlen der Aldolase und Cytochromen sind die Milchsäurebakterien zwar anaerob, gleichzeitig jedoch sauerstoffunempfindlich und somit aerotolerant. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal der Milchsäurebakterien ist ihre optimale Wachstumstemperatur. Bei den mesophilen Bakterien liegt diese zwischen 18 - 32 °C, bei den thermophilen zwischen 35 - 45 °C (Riemelt et al., 2007; Salminen et al., 2004). Im Unterschied zu vielen anderen Mikroorganismen sind die Milchsäurebakterien auf keine Eisenquelle in der Umgebung angewiesen (Pandey et al., 1994). Es fehlt den Bakterien jedoch die Fähigkeit, bestimmte Nährstoffe wie Aminosäuren oder Vitami-

ne selbst zu bilden. Somit sind sie auf besonders nährstoffreiche Umgebungen angewiesen, zu denen neben der Milch, in der das Eisen in gebundener Form vorliegt, vor allem auch absterbendes Pflanzenmaterial und der humane Darmtrakt zählen (Campbell & Reece, 2009; Fuchs et al., 2007). Für die Menschen sind die meisten Milchsäurebakterien nicht pathogen und zählen zu den wichtigsten Vertretern der menschlichen Darm- und Schleimhautflora (Bolotin et al., 2001). Zudem konnten für einige Bakterienspezies probiotische Wirkungen nachgewiesen werden (Heller, 2001).

Heutzutage werden die Milchsäurebakterien im Bereich der Milchwirtschaft gezielt als Starterkulturen eingesetzt. Je nach der verwendeten Bakterienspezies und dem gewünschten Lebensmittel können Struktur, Geschmack oder Aroma beeinflusst werden. Für die industrielle Fermentation spielen vor allem *Lactococcus lactis* (*L. lactis*), *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*), *Lactobacillus* und *Leuconostoc* (*Ln.*) Starterkulturen eine wichtige Rolle (Mahony et al., 2012; Hemme & Foucaud-Scheunemann, 2003). *L. lactis* Stämme mit den beiden Subspezies *L. lactis* spp. *lactis* und *L. lactis* spp. *cremoris* zählen zu den mesophilen Starterkulturen und übernehmen während der Fermentation hauptsächlich Aufgaben der Säureproduktion. Erst am Ende der Gärung werden durch diese Stämme zusätzlich Geschmack und Aroma beeinflusst (Bolotin et al., 2001). *S. thermophilus*-Kulturen gehören zu den thermophilen Milchsäurebakterien und kommen hauptsächlich bei der Herstellung von Joghurt sowie einigen Käsesorten wie Emmentaler oder Mozzarella zum Einsatz (Riemelt et al., 2007; Quiberoni et al., 2006). *Leuconostoc* Kulturen stellen dagegen nur eine Minorkomponente (1-10 %) in vielen mesophilen Mischkulturen dar (Cogan & Jordan, 1994). Die beiden Subspezies *Ln. mesenteroides* und *Ln. pseudomesenteroides* werden dabei hauptsächlich eingesetzt (Ali et al., 2013; Zamfir et al., 2006) - häufig in Verbindung mit den *L. lactis* Stämmen (Hemme & Foucaud-Scheunemann, 2004). Während der Fermentation übernehmen die *Leuconostoc* Kulturen die Aufgaben der Geschmacks- und der Aromabildung, indem Citrat zu Acetyl, Acetoin und Diacetyl umgesetzt wird (Kot et al., 2014a, 2014b; Vedamuthu, 1994).

Die Fermentation der Milch durch die Milchsäurebakterien unterliegt jedoch häufig vielen Störfaktoren, die das Wachstum und damit die Aufgaben der Milchsäurebakterien hemmen (z.B. reduzierte Säuerung). Dazu gehören einige Hemmstoffe wie Antibiotika oder Reinigungs- und Desinfektionsmittel (Salminen et al., 2004), aber auch natürlicherweise in der Milch enthaltene Stoffe wie Lysozyme oder Immunglobuline

(Marcó et al., 2012). Den wichtigsten Störfaktor im Bereich der Milchfermentationen stellt jedoch nach wie vor die Infektion der Starterkulturen mit Bakteriophagen dar (Murphy et al., 2013; Moineau & Lévesque, 2005; Daly et al., 1996).

1.2 Bakteriophagen

Bakteriophagen (abgekürzt Phagen) sind Viren, die Bakterien oder Archaeen befallen, diese infizieren und anschließend zerstören (Clokier et al., 2011; Neve, 1996). Sie wurden fast gleichzeitig von dem Engländer A. F. Twort und dem Kanadier F. d'Herelle unabhängig voneinander entdeckt und beschrieben (Twort, 1915; d'Herelle 1917). F. d'Herelle ist für die noch heute gültige Bezeichnung der Bakteriophagen (griechisch: *bakterion* „Stäbchen“, *phagos* „Fresser“) verantwortlich. Schätzungsweise stellen Bakteriophagen mit einer Anzahl von 10^{31} Virionen die größte und häufigste biologische Einheit der Welt dar (McNair et al., 2012). Damit sind die Phagen, ähnlich wie ihre Wirte, ubiquitär verbreitet (Breitbart & Rohwer, 2005; Hendrix, 2003).

Bakteriophagen sind im Unterschied zum Großteil der Viren sehr komplex aufgebaut. Der Phagenkopf (Kapsid) besitzt eine isodiametrische oder prolate Form (Abb. 1.1) und ist aus sog. Kapsomeren (Proteinen) aufgebaut. Im Inneren des Kopfes befindet sich das Phagengenom, welches als einzelstängige oder doppelstängige DNA oder RNA vorliegen und entweder linear oder zirkulär strukturiert sein kann. Direkt an den Kopf ist meist ein Kragen angeheftet, an den ein Proteinschwanz anschließt. Dabei handelt es sich um ein stäbchenförmiges Rohr, welches von einer kontraktilen Hülle umgeben sein kann (Aksyuk et al., 2009). Am unteren Ende schließt bei einigen Phagen der Protein-

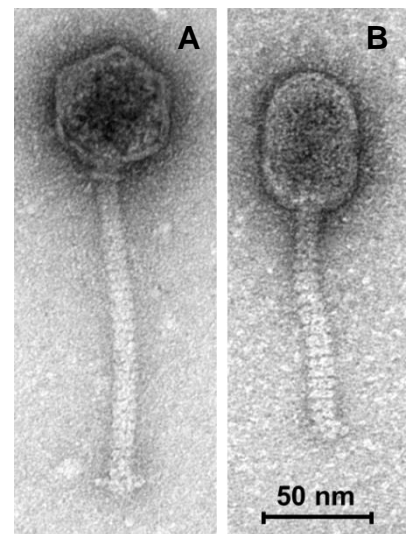


Abb. 1.1: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der *L. lactis* Phagen P008 (A) und P001 (B).

schwanz mit einer Basisplatte ab. Diese kann zusätzlich eine oder mehrere Fibern bzw. Spikes enthalten, mit deren Hilfe sich die Phagen an die Bakterienzellen anheften können (Heller et al., 2011; Walter et al., 2008; Neve, 1996). Auf den Fibern sitzen die sog. Rezeptorbindeproteine, mit denen ein Phage die Bindestellen an der Bakterienoberfläche erkennen und ähnlich dem Schlüssel-Schloss-Prinzip binden kann (Spinelli et al., 2014; Moldovan et al., 2007). Somit besitzen die Phagen eine

hohe Wirtsspezifität und sie sind meist in der Lage nur eine Bakterienspezies bzw. -stamm zu infizieren. Da die Bakteriophagen sich nicht autonom vermehren können und zudem keinen eigenen Stoffwechsel besitzen, sind sie zu ihrer Vermehrung auf bakterielle Wirtszellen angewiesen. Die Lyse einer Bakterienzelle verläuft dabei in mehreren Schritten (Abb. 1.2). Phagen sind von einem zufälligen Zusammentreffen, z.B. durch Diffusion in einer wässrigen Lösung oder Übertragung durch die Luft in Form von Aerosolen, mit einer Bakterienzelle abhängig (Heller et al., 2011). Sobald jedoch ein Phage auf eine Zelle trifft, erfolgt im ersten Schritt eine reversible Bindung mit dem Phagenschwanz an die Rezeptorstrukturen der Bakterienoberfläche. Dabei fungieren oft Zuckerreste der bakteriellen Zellwand als Rezeptoren (Fox, 2004). Erfolgt daraufhin die zweite Bindung an den eigentlichen Phagenrezeptor, dann spricht man von einer irreversiblen Bindung (Adsorption). Die Anwesenheit zweiwertiger Kationen (Ca^{2+} oder Mg^{2+}) im Medium kann diesen Vorgang zusätzlich begünstigen (Geller et al., 2005; Watanabe & Takesue, 1972). Im nächsten Schritt wird die DNA des Phagen aus dem Phagenkopf durch den Schwanz in das Innere der Bakterienzelle injiziert (Poeggel, 2013). Dabei nutzen Phagen spezielle Enzyme, die die Peptidoglykane der bakteriellen Zellwand auflösen und damit den Einlass der DNA in das Zytoplasma der Bakterienzelle ermöglichen (Farley et al., 2016). Nach der Injektion der Phagen-DNA in die Zelle kann die Phagenvermehrung über zwei unterschiedliche Zyklen erfolgen – lytisch oder lysogen (auf die Sonderform der filamentösen Phagen wird hier nicht eingegangen). Welcher der beiden Wege verfolgt wird, ist vor allem von dem physiologischen Zustand der Zelle sowie von der „multiplicity of infection“ (MOI) abhängig (Ptashne, 2004). Bei dem lytischen Zyklus erfolgt direkt nach der Injektion der Phagen-DNA in die Bakterienzelle eine komplette Umstellung des bakteriellen Stoffwechsels. Die Wirts-DNA wird abgebaut und die Phagen-DNA repliziert. Parallel werden neue Strukturproteine in der Zelle produziert, welche anschließend zu Kopf- und Schwanzstrukturen aufgebaut werden. Daraufhin wird die neu-hergestellte DNA in die Phagenköpfe verpackt, mittels phageneigener Enzyme Endolysin und Holin die bakterielle Zellwand abgebaut und die neu-synthetisierten Phagen werden freigesetzt (Wang et al., 2000; Neve, 1996). Die Wurfgröße (burst size) unterscheidet sich je nach Phagen bzw. Phagengruppe und kann bis zu 300 Phagen pro Bakterienzelle betragen (Neve, 1996). Die Latenzzeit, die Zeit von der Adsorption bis zur bakteriellen Zelllyse, dauert im Durchschnitt ca. 20 min, kann jedoch ähnlich der Wurfgröße je nach Phagengruppe variieren (Wang,

2006). Treten die Phagen den lytischen Zyklus an, so spricht man von virulenten Phagen. Phagen, die den lysogenen Zyklus durchschreiten werden als temperent bezeichnet (Campbell & Reece, 2009). Im lysogenen Zyklus wird die Phagen-DNA nach der Injektion in die Bakterienzelle durch homologe Rekombination in das bakterielle Genom integriert. Dies erfolgt mittels einer phagenkodierten Integrase (Fogg et al., 2014). Die Phagen-DNA kann in der Bakterienzelle jedoch auch als Plasmid vorliegen. Bei jeder Replikation der Wirts-DNA wird das Plasmid bzw. die integrierte Phagen-DNA in Form eines Prophagen mitrepliziert und an die folgende Generation weitergegeben (Poeggel, 2013). In dem Zustand der Lysogenie kann ein Phage über einen sehr langen Zeitraum verbleiben, jedoch jederzeit durch umgebende Stressfaktoren wie UV-Strahlung oder DNA-Schädigung induziert werden und in den lytischen Zyklus übergehen. Dieser Prozess kann durch äußere Faktoren, aber auch spontan eingeleitet werden und so zur Freisetzung neuer Phagengenerationen führen (Choi et al., 2010, Riemelt et al., 2007). Viele der temperenten Phagen besitzen zudem die Fähigkeit, im lysogenen Zustand die Wirtszelle durch den Mechanismus der „*super infection exclusion*“ vor der Infektion des Bakteriums durch andere Phagen zu schützen (Weber, 2010; McGrath et al., 2002). In der Abbildung 1.2 sind die beiden Vermehrungszyklen der Bakteriophagen graphisch dargestellt.

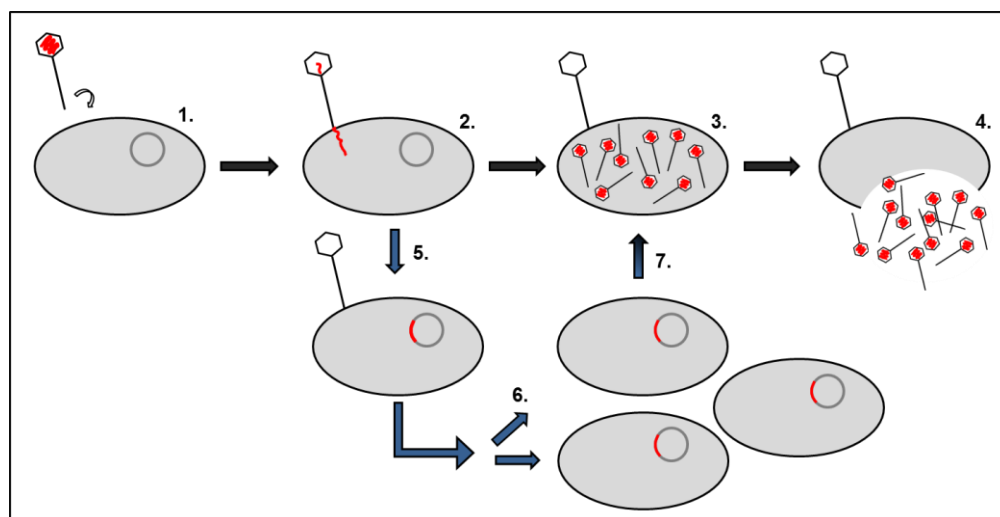


Abb. 1.2: Der Lebenszyklus von Bakteriophagen. Lytische (schwarze Pfeile) und lysogene (blaue Pfeile) Vermehrung der Bakteriophagen. 1. Adsorption; 2. DNA-Injektion; 3. Phagenvermehrung; 4. Lyse der Bakterienzelle; 5. Integration der Phagen-DNA; 6. Vermehrung der lysogenen Wirtszellen; 7. Induktion des Prophagen (modifiziert nach Neve & Heller, 2013).

Die erste Einteilung der Phagen wurde von dem Engländer D. E. Bradley vorgenommen (Bradley, 1967). Basierend auf der Morphologie der Phagen und deren Nukleinsäure erfolgte die Einteilung in sechs Grundtypen A-F (Abb. 1.3). Die Typen

A-C stehen dabei für die geschwänzten Phagen mit doppelsträngiger DNA, die Typen D und E umfassen polyedrischen Phagen mit Einzelstrang-DNA (Typ D) bzw. Einzelstrang-RNA (Typ E) und der Typ F berücksichtigt die filamentösen Phagen mit einer Einzelstrang-DNA.

Nur einige Jahre später, nämlich 1974, überarbeitete Ackermann die Phageneinteilung von Bradley, durch Einfügen eines neu-entdeckten pleomorphen Phagentyps (Typ G), sowie Einteilung der geschwänzten Phagen (Typ A-C) anhand ihrer Kopfform in isodiametrisch- (A1-C1) prolat- (A2-C2) und lang-prolat- (A3-C3) köpfige Phagen (Abb. 1.3) (Ackermann & Eisenstark, 1974). Geschwänzte Phagen werden gemäß der Klassifikation zur Ordnung *Caudovirales* zusammengefasst, welche ca. 96 % aller, bis dato beschriebenen Phagen umfasst. Sie lassen sich in drei Familien der *Myoviridae*, der *Siphoviridae* und der *Podoviridae* unterteilen (Ackermann, 2011). Zu der Familie *Myoviridae* zählen Phagen mit langen, kontraktilem Schwanz, zu der Familie *Siphoviridae* Phagen mit einem langen, nicht-kontraktilem Schwanz und die Phagen der Familie *Podoviridae* besitzen einen kurzen, nicht-kontraktilem Schwanz (Neve, 1996; Ackermann et al., 1984). Eine weitere Einteilung der Phagen in Gattungen und Gruppen wird anhand weiterer Faktoren wie der Genomgröße, der Genomkonfiguration, der Genomsequenz, der Serologie usw. vorgenommen (Heller et al., 2011).

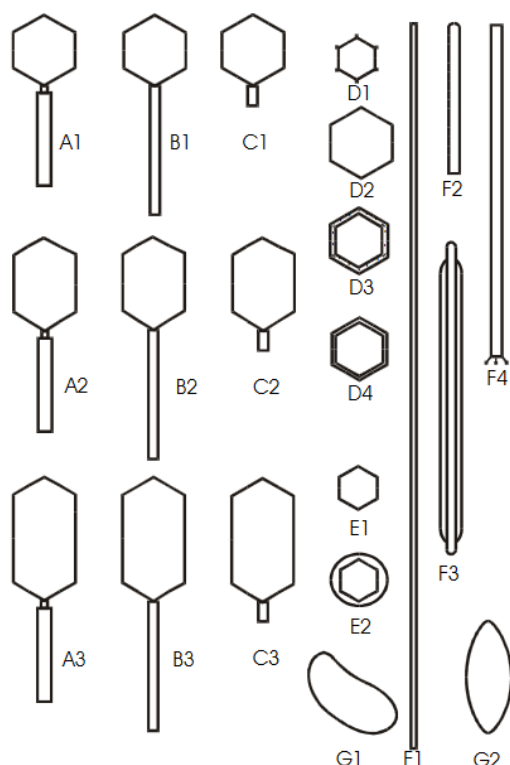


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Phagenfamilien *Myoviridae* (A), *Siphoviridae* (B) und *Podoviridae* (C) mit ihren Kopfstrukturen: isodiametrischer Kopf (1), kurzer prolat Kopf (2) und langer prolat Kopf (3). (nach Ackermann, 2011).

Bereits kurz nach der Entdeckung der Phagen wurden deren therapeutische Anwendungsmöglichkeiten erkannt und v. a. durch d'Hellere intensiv erforscht und beschrieben (d'Herelle, 1930). Doch die Entdeckung und der erste Einsatz von Antibiotika im Jahr 1941, sowie politische Diskrepanzen zwischen den West- und Oststaaten führten dazu, dass die Phagentherapie in den westlichen Ländern zunehmend in den Hintergrund geriet (Housby & Mann, 2009; Sulakvelidze & Kutter, 2005; Chibani-Chennoufi et al., 2004; Summers, 2001).

In den letzten Jahrzehnten hat jedoch die häufige Verwendung von Antibiotika, sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin, dazu geführt, dass die Zahl antibiotikaresistenter Bakterien stetig zugenommen hat. Das Europäische Zentrum für die Prävention und Kontrolle von Krankheiten (ECDC) und die Europäische Arzneimittelbehörde (EMA) schätzten, dass jährlich in Europa ca. 25.000 Todesfälle auf antibiotikaresistente Erreger zurückzuführen sind – Tendenz steigend. Diese alarmierenden Zahlen haben dazu geführt, dass Phagen erneut für therapeutische und diagnostische Anwendungen in Betracht gezogen wurden.

Phagen sind aufgrund ihrer ubiquitären Verbreitung und verhältnismäßig leichter Isolierung und Kultivierung (Mahony et al., 2014; Mc Grath et al., 2007; Chibani-Chennoufi et al., 2004) sehr preiswert und durch ihre starke Wirtsspezifität bestens dazu geeignet, gezielt pathogene Keime zu inaktivieren. Studien zum Einsatz von Phagen als Biokontrollwerkzeuge in Lebensmitteln oder zur Kontrolle von bakteriellen Infektionen haben bereits vielversprechende Ansätze gezeigt (Brüssow, 2012; Lu & Koeris, 2011; Mahony et al., 2011; Kutateladze & Adamia, 2010; Alisky et al., 1998). Nichtsdestotrotz weisen vor allem therapeutische Anwendungen von Phagen einen enormen Forschungsbedarf auf. Denn gerade wegen der hohen Wirtsspezifität der Phagen, ist eine schnelle Diagnose über die Art der Erreger in jedem speziellen Krankheitsfall von besonderer Bedeutung.

1.3 Bakteriophagen der Milchsäurebakterien

1.3.1 *L. lactis* Phagen

Die Gruppe der *L. lactis* Phagen gehört zu den am meisten und besten untersuchten Bakteriophagen der Milchsäurebakterien (Mahony et al., 2014; Marcó et al., 2012; Miklic & Rogelj, 2003; Bissonnette et al., 2000; Moineau et al., 1996). Es handelt sich dabei um eine sowohl morphologisch als auch genetisch sehr heterogene Gruppe.

Phagen dieser Gruppe werden den beiden Familien *Siphoviridae* und *Podoviridae* zugeordnet und werden, wie in Abbildung 1.4 dargestellt, in zehn verschiedene Gruppen eingeteilt (Mahony & van Sinderen, 2014; Deveau et al., 2006).

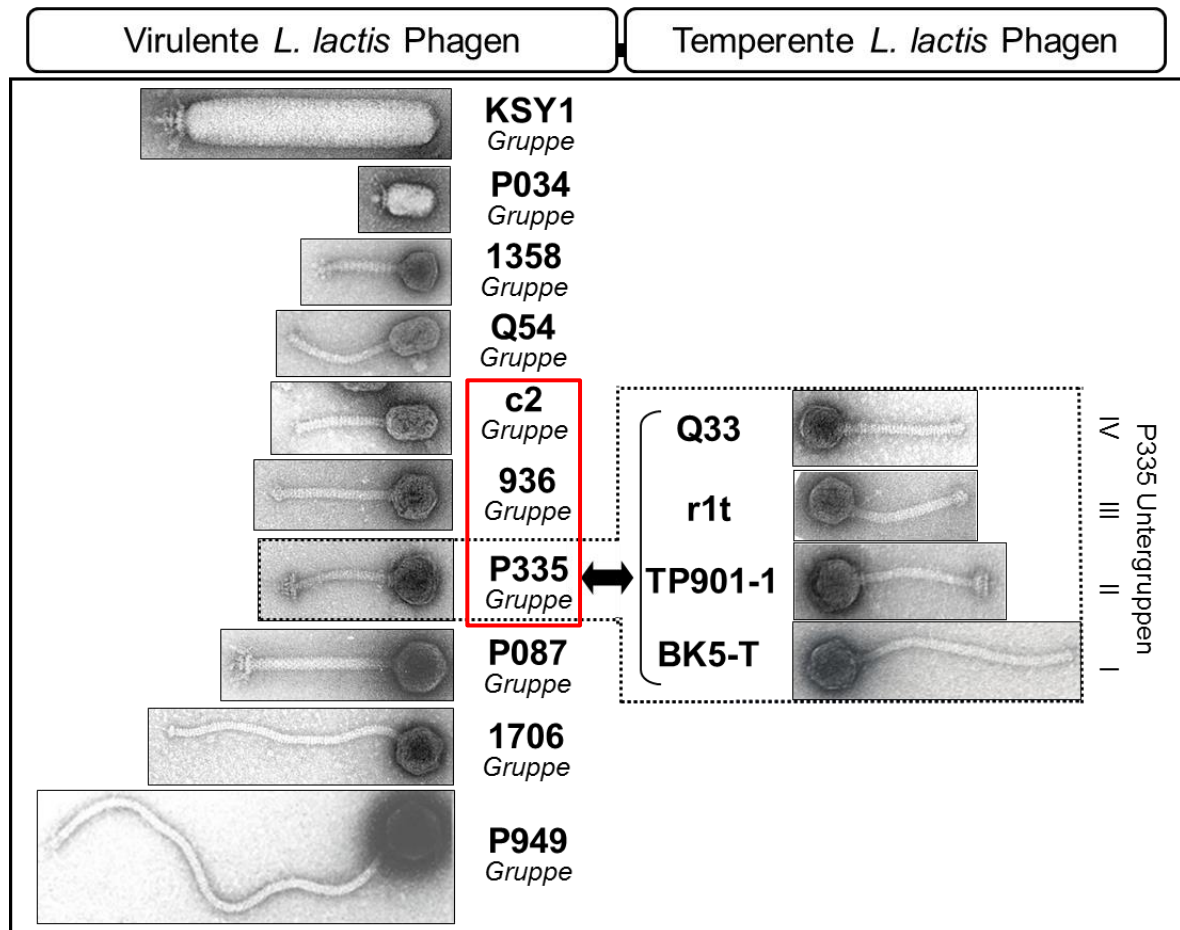


Abb. 1.4: Klassifizierung der *L. lactis* Phagen (mod. nach Atamer et al., 2012). Rote Box: Phagen-
gruppen, die am häufigsten mit Fermentationsstörungen assoziiert sind.

Drei der zehn Gruppen (rot umrandet) werden dabei am häufigsten mit Fermentationsstörungen assoziiert: die Gruppen 936, (Morphotyp B1), c2 (Morphotyp B2) und P335 (Morphotyp B1) (Murphy et al., 2013; Atamer et al., 2009; Madera et al., 2004). Von den 10 Gruppen der *L. lactis* Phagen sind neun strikt virulent. Lediglich die P335 Gruppe enthält temperente Phagen, die sich zusätzlich in vier morphologisch heterogene Subgruppen einteilen lassen: Q33-, r1t-, TP901-1- und den BK5-T-Phagentyp (Atamer et al., 2012).

1.3.2 *S. thermophilus* Phagen

Unter den *S. thermophilus* Phagen sind sowohl virulente, als auch temperente Phagen (1 – 10 % der Stämme mit einem Prophagen (Neve et al., 1998)) zu finden, die

der *Siphoviridae* Familie zugeordnet werden. Die *S. thermophilus* Phagen werden zurzeit in vier unterschiedliche Gruppen eingeteilt (Mahony & van Sinderen, 2014). Morphologisch sind die ersten zwei Phagengruppen kaum voneinander unterscheidbar (isodiametrischer Kopf und langer, nicht-kontraktiler Schwanz von ca. 240 nm (Brüssow et al., 1994)). Eine Differenzierung ist lediglich auf der genetischen Ebene anhand der Anzahl an Hauptstrukturproteinen und des Verpackungsmechanismus ihrer DNA in „pac“- und „cos“-Typ möglich (LeMarrec et al., 1997). Während der „cos“-Typ Phage zwei Hauptstrukturproteine aufweist, besitzt der „pac“-Typ Phage drei Hauptstrukturproteine (Neve et al., 1998; LeMarrec et al., 1997). Zusätzlich verpacken die „pac“-Typ Phagen ihre DNA nach dem „Head-Full“-Mechanismus, während die „cos“-Typ Phagen kohäsive DNA-Enden besitzen. Die dritte Gruppe der *S. thermophilus* Phagen wird durch den Phagen 5093 repräsentiert, der sich genetisch und morphologisch (Basisplatte mit kugelförmigen Anhängen) von den anderen Phagen unterscheidet (Mills et al., 2011). Die letzte *S. thermophilus* Phagengruppe ist die 987 Gruppe, die sich durch ein Hybridgenom auszeichnet, bestehend aus den Genomen der *S. thermophilus* Phagen und der *L. lactis* Phagengruppe P335 (McDonnell et al., 2016).

1.3.3 *Ln. pseudo-/mesenteroides* Phagen

Phagen der *Leuconostoc* Bakterien wurde bis vor einigen Jahren nur sehr wenig Aufmerksamkeit geschenkt, wodurch diese nur relativ selten isoliert und charakterisiert wurden (Pujato et al., 2015, 2014; Atamer et al., 2011; Davey et al., 1995; Boizet et al., 1992; Shin, 1983). Dies hängt damit zusammen, dass die Säuerungsfehler, die durch *L. lactis* oder *S. thermophilus* Phagen verursacht werden, viel schneller detektierbar sind als die durch *Leuconostoc* Phagen verursachte Aroma- oder Geschmacksbeeinträchtigungen.

Die erste Einteilung der *Leuconostoc* Phagen wurde von Ali et al. (2013) anhand der Morphologie vorgenommen und später durch Kot et al. (2014) durch Genotypisierung erweitert (Abb. 1.5). Morphologisch handelt es sich bei den *Leuconostoc* Phagen um eine Phagengruppe mit relativ wenig Variation. Alle Phagen sind isodiametrisch-köpfige *Siphoviridae* Phagen mit nicht kontraktilen Schwänzen von ca. 140 nm. Das einzige Unterscheidungsmerkmal der *Leuconostoc* Phagen liegt in der Struktur ihrer Basisplatten (Kot et al., 2014b), anhand derer sechs Subgruppen unterschieden

werden (Abb. 1.5). *Ln. mesenteroides* Phagen werden dem Morphotyp I zugeordnet mit kugelförmigen (Ia) oder Y-förmigen (Ib) Basisplattenanhängen, während die *Ln. pseudomesenteroides* Phagen dem Morphotyp II zugeordnet werden (ebene Basisplatten mit (IIa) oder ohne Kragen (IIb), "flauschige" Basisplattenanhänge (IIc) und Schwanzstreifen (IId)). Zusätzlich werden die Phagen anhand ihrer Wirtsspezifität unterteilt. Den *Ln. pseudomesenteroides* Phagen werden die Wirtsspektren A1 und A2 zugeordnet, während die Phagen der *Ln. mesenteroides* die Wirtsspektren B1 und B2 besitzen (Kot et al., 2014b; Ali et al., 2013).

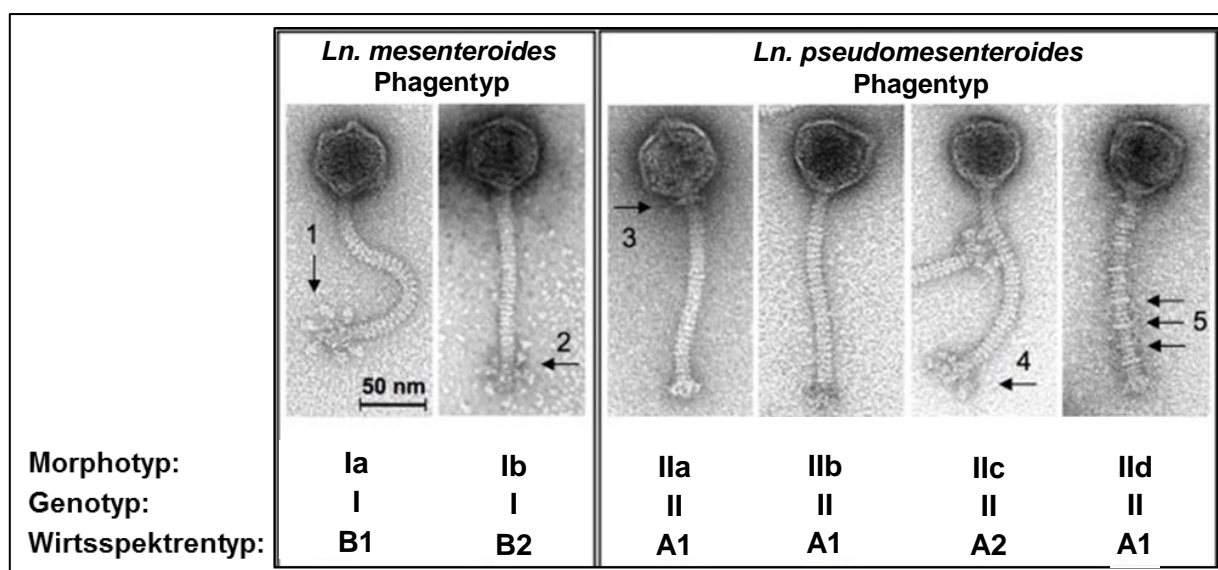


Abb. 1.5: Übersichtsschema zur *Ln. mesenteroides* und *Ln. pseudomesenteroides* Phagentaxonomie basierend auf der Transmissionselektronenmikroskopie, Genotypisierung und Wirtsspektren der Phagen. Die Pfeile zeigen (1) kugelförmige Basisplattenanhänge, (2) Y-förmige Basisplattenanhänge, (3) ebene Basisplatten mit Kragenstruktur, (4) "flauschige" Basisplattenanhänge, (5) Schwanzstreifen (modifiziert nach Kot et al., 2014b).

Grundsätzlich finden sich unter den *Ln. mesenteroides* und *Ln. pseudomesenteroides* Phagen, die in der Vergangenheit aus verschiedenen Milchprodukten isoliert wurden, sowohl virulente als auch wenige temperente Phagen (Atamer et al., 2011; Jang et al., 2010).

1.4 Bakteriophagen in der Milchwirtschaft

Die Anwesenheit der Bakteriophagen in der Milchindustrie stellt seit vielen Jahrzehnten ein ernstes Problem für viele Molkereien und milchverarbeitende Betriebe dar (Moineau & Lévesque, 2005). Da Bakteriophagen allgegenwärtig sind und immer mit Bakterien assoziiert sind, ist ihre Anwesenheit in Milchfermentationen praktisch nicht

zu verhindern. Fermentationsstörungen durch Phagen sind jedoch für die Molkereien mit finanziellen Einbußen verbunden, denn nicht nur längere Produktionszeiten und verminderte Qualität der Produkte, sondern auch eine geringe Säuerung, verbunden mit - im schlimmsten Fall - komplettem Produktionsausfall, sind häufig die Folgen (Atamer et al., 2011; Quiberoni et al., 2006; Neve, 1996). Man schätzt, dass der Anteil der Schäden, die auf Phagen zurückzuführen sind, im Bereich der Milchfermentationen bei etwa 1-10 % liegt (Bogosian, 2006).

Rohmilch, die als Hauptquelle für Bakteriophagen in den Molkereien gilt, wird häufig bereits während des Melkprozesses mit Phagen infiziert (ca. 10 %) und kann von hier aus die Phagen über den gesamten Produktionsprozess verbreiten (Madera et al., 2004). Zwar wird die Milch vor der Fermentation meist pasteurisiert, jedoch sind die dabei zum Einsatz kommenden Temperatur-/Zeit-Kombinationen von 72-75 °C für 15-30 s nicht ausreichend, um eine komplette Phageninaktivierung zu erreichen (Atamer & Hinrichs, 2010; Atamer et al., 2009; Müller-Mehrbach et al., 2005a, 2005b; Quiberoni et al., 2003; Suarez & Reinheimer, 2002). Eine Erhitzung der Milch bei höheren Temperaturen und über einen längeren Zeitraum ist zwar möglich, jedoch würde dies mit organoleptischen Veränderungen der Milch einhergehen und zudem zu einer gestörten Dicklegung der Milch führen (Heller et al., 2011; Madera et al., 2004). Folglich lassen sich die Phageninfektionen nie vollständig verhindern, sondern lediglich z.B. durch eine strikte Trennung der Produktionsbereiche minimieren (Heller et al., 2011). Dass die Phagen sich gut entlang der Produktionskette anreichern können, wird am Beispiel Molke (als Nebenprodukt der Käseherstellung) besonders deutlich. Ausgehend von einer Phagenkonzentration von ca. 10^4 Plaque-bildende Einheiten (PbE)/ml Rohmilch (McIntyre et al., 1991), sind Phagentiter von bis zu 10^9 PbE/ml Molke am Ende der Käseproduktion keine Seltenheit (Ly-Chatain et al., 2011; Atamer et al., 2009; Neve, 1996). Ein weiteres Problem in vielen Molkereien sind die Phagenaerosole, die über die Luft in Konzentrationen von bis 10^8 PbE/m³ weitergetragen werden können (Neve et al., 1995).

Die Widerstandsfähigkeit der Phagen gegenüber vielen Stressfaktoren wie beispielsweise Hitze (Atamer et al., 2009; Müller-Merbach et al., 2005a, 2005b) oder Druck (Guglielmotti et al., 2012) in Verbindung mit der ubiquitären Verbreitung der Phagen in den Molkereien machen sie für die Industrie zu einem großen Problem, für die Wissenschaft hingegen zu einem interessanten Forschungsobjekt – u.a. bei der Suche nach neuen Methoden zur Phageninaktivierung bzw. Phagenminimierung.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Bakteriophagen der Milchsäurebakterien sind in milchverarbeitenden Betrieben die Hauptursache für Fermentationsstörungen, Aroma- und Texturdefekte. Für die Rückführung von phagenhaltigem Molkenpulver oder von Molkenbestandteilen in den Fermentationsprozess muss daher die Phagenbelastung ausreichend minimiert werden, um eine weitere Anreicherung der Phagen im Betrieb zu vermeiden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher zunächst in einem Phagenscreening Molkenpulverproben und Molkenpulverformulierungen auf Bakteriophagen für mesophile und thermophile säurebildende Starterkulturen (*L. lactis*, *S. thermophilus*) und für mesophile Aromakulturen (*Ln. pseudomesenteroides*, *Ln. mesenteroides*) geprüft werden. Von den Phagenisolaten aus den Pulverproben sollte die thermische Stabilität bestimmt und bewertet werden. Weiterhin sollte die Langzeitstabilität der *L. lactis* Phagen in den Pulverproben bei mehrjähriger Lagerung erfasst werden.

Zum Vergleich der (publizierten) Daten der thermischen Inaktivierung unter Laborbedingungen mit denen einer – bisher nicht beschriebenen - Inaktivierung in einer Pilot-Pasteurierungsanlage sollten mit repräsentativen thermosensitiven und thermoresistenten Phagen Erhitzungsversuche in Milch zur Bestimmung „praxisnaher“ *D*- und *z*-Werte in der Pilotanlage durchgeführt werden.

Als nicht-thermische Alternative zur Phageninaktivierung sollten Cross-Flow-Membranfiltrationsversuche mit Membranen unterschiedlicher nominaler Porenweite zur Reduktion der *L. lactis* Phagentiter in Molke durchgeführt werden, um den bestmöglichen Kompromiss zwischen maximaler Phagenretention und minimaler Denaturierung der Molkenproteine zu bestimmen. Dafür sollten Laktokokkenphagen unterschiedlicher Morphologie und Größe getestet werden. Geprüft werden sollte weiterhin die Option, die Effizienz der Membranfiltration durch Zugabe von pasteurisierten, inaktivierten Wirtszellen oder von mechanisch gewonnenen Zelltrümmern zur Ausbildung einer erwünschten Fouling-Schicht auf den Membranen zu verbessern.

Da phagenbedingte Aromastörungen – im Gegensatz zu Säuerungsstörungen – bisher kaum dokumentiert wurden, sollte der Einfluss einer *Leuconostoc* Phageninfektion auf die Aromaentwicklung sowie auf das organoleptische Profil von Sauermilch und Käse untersucht werden. Die von den *Leuconostoc* Phagen verursachten Veränderungen in den fermentierten Milchprodukten sollten dabei sowohl von einem Sensorikpanel als auch mit einer Elektronischen Nase erfasst und verglichen werden.

Kapitel 2

Charakterisierung und thermische Inaktivierung der aus Molkenpulver isolierten Bakteriophagen der Milchsäurebakterien

Teile des nachfolgenden Kapitels wurden bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Wagner, N., Brinks, E., Samtlebe, M., Hinrichs, J., Atamer, Z., Kot, W., Franz, C. M. A. P., Neve, H. & Heller, K.J. (2017). Whey powders are a rich source and excellent storage matrix for dairy bacteriophages. *International Journal of Food Microbiology*, 241: 308-317.

Wagner, N., Samtlebe, M., Franz, C. M. A. P., Neve, H., Heller, K.J., Hinrichs, J. & Atamer, Z. (2017). Dairy bacteriophages isolated from whey powder: thermal inactivation and kinetic characterization. *International Dairy Journal*, 68: 95-104.

2.1 Einleitung

Bakteriophagen sind allgegenwärtig. Sie werden regelmäßig in der Rohmilch nachgewiesen und können aufgrund von unsterilen Fermentationsbedingungen oder einer Verunreinigung des Ausgangsmaterials (z.B. Milch, Molke oder Pulver) in den Fermentationsprozess eingebracht werden (Garneau & Moineau 2011; Neve et al., 1995). Da ein Großteil der Phagen in der Lage ist, Wärmebehandlungen der Milch zu überstehen, können sie sich im weiteren Verlauf der Milchverarbeitung, beispielsweise während der Käseherstellung, anreichern - in Phagentitern von bis zu 10^9 PbE/ml Käsamolke (Murphy et al., 2014; Atamer et al., 2009; Neve 1996, Neve et al., 1995; McIntyre et al., 1991). Bestandteile der Käsamolke werden wiederrum von der Milchindustrie vielfältig wiederverwendet und als Molkenpulver, Molkenrahm oder Molkenprotein zur Steigerung der Trockenmasse und Verbesserung der Textureigenschaften verschiedenen Produkten zugesetzt (Atamer et al., 2013; Schenkel et al., 2013; Toro-Sierra et al., 2013; Hinrichs, 2001; Schenkel et al., 2011). Molkenprotein-Konzentrat und Molkenprotein-Isolat, die als Pulver auf den Markt gebracht werden, gehören hierbei zu den am häufigsten produzierten Molkenprodukten (Çakır-Fuller, 2015; Lagrange et al., 2015).

Bei der Herstellung von Molkenpulvern wird zuerst das Molkenfett zusammen mit sonstigen Verunreinigungen von der Molke abgetrennt und anschließend auf ca. 55 % Trockensubstanzgehalt verdampft bzw. aufkonzentriert. Danach wird das Molkenkonzentrat dehydratisiert (Märtlbauer & Becker, 2016). Das dabei am häufigsten angewendete Verfahren ist die Sprühtrocknung. Das Molkenkonzentrat wird durch Zentrifugalzersträubung oder durch Düsenversprühung im Sprühturm fein verteilt und mit Heißluft (180 - 220 °C) im Gleichstrom oder Gegenstrom getrocknet (Märtlbauer & Becker, 2016). Aufgrund der stetigen Kühlung während der Trocknung erreicht die Verdampfungstemperatur der Molkenpartikel jedoch max. 60 °C (Walstra et al., 2006; Kessler, 2002; Belitz & Grosch, 1987). Bereits 1980 hatte Chopin den Einfluss von Sprühtrocknung auf 17 *L. lactis* Phagen untersucht. Mit einer Titerreduktion von weniger als 1 log-Stufe, konnten dabei die meisten Phagen diesen Prozess überstehen. Zu den bereits genannten Strategien der Phageninaktivierung in der Milchindustrie zählen neben der Anwendung von Druck (Mahony et al., 2012; Atamer et al., 2009; Müller-Merbach et al., 2005a, 2005b; Moroni et al., 2002) auch die Inaktivierung der Phagen durch physikalische Methoden (z.B. Bestrahlung, Membranfiltration) und

chemische Mittel (Samtlebe et al, 2015; Grove et al, 2006; Capra et al., 2004; Staczek et al., 1998). Die meist erforschte Methode der Phageninaktivierung bleibt jedoch die Hitzebehandlung. Vor allem die *Lactococcus (L.) lactis* Phagen zeigen eine bemerkenswert hohe thermische Resistenz. Die *L. lactis* Phagen P680 und P1532 sind in der Lage, Temperaturen von über 95 °C für mehrere Minuten zu überstehen und gehören damit zu den bis dato thermoresistentesten Phagen der Milchsäurebakterien (Atamer et al., 2010). Aber auch die Hitzeresistenz anderer Phagenspezies wie beispielsweise *Leuconostoc*, *Lactobacillus* oder *S. thermophilus* waren häufig Gegenstand vieler Untersuchungen (Capra et al., 2013; Guglielmotti et al., 2011; Atamer et al., 2011; 2009; Quiberoni et al., 2003). Dabei zeigte sich eine hohe Varianz der Thermobeständigkeit zwischen den Phagen unterschiedlicher Bakterienspezies.

Eine Vielzahl von Autoren hat in der Vergangenheit Phagen aus verschiedenen Milchprodukten wie beispielsweise Milch, Molke, Salzlake, Quark, Joghurt und Buttermilch isoliert (Murphy et al., 2014; Capra et al, 2013; Guglielmotti et al, 2012; Atamer et al., 2011, 2009; Quiberoni et al., 2003). Vergleichsweise wenig Aufmerksamkeit wurde bis dato dem Auftreten und der Inaktivierung von Phagen in Trockenmilchprodukten wie z.B. Molkenpulver geschenkt. In einer Masterarbeit mit dem Titel „Nachweis und Typisierung von Bakteriophagen der Milchsäurebakterien in Molkenpulver und Molkenpulverformulierungen“ (Wagner, 2012) wurden 55 Phagen aus Molkenpulver isoliert und hinsichtlich ihrer Morphologie, Diversität und Spezieszugehörigkeit charakterisiert. Es wurden hohe Phagenkonzentrationen von bis zu 6×10^7 Plaque-bildenden Einheiten (PbE)/g Molkenpulver nachgewiesen. Da angenommen wurde, dass Phagen aus dem sprühgetrockneten Pulver eine höhere Hitzebeständigkeit aufweisen als Phagen aus flüssigen Milchprodukten, hatte die vorliegende Studie zum Ziel, diese Phagen, v. a. die Phagen der *L. lactis* Bakterienspezies, in Bezug auf ihre Thermoresistenz zu untersuchen. Weiterhin sollte die Inaktivierungskinetik eines besonders hitzeresistenten Phagen im Testmedium Wasser und Magermilch miteinander verglichen werden. Darüber hinaus sollte die Langzeitstabilität der isolierten Phagen im Verlauf einer vierjährigen Lagerung untersucht werden.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Bakterienstämme und Bakteriophagen

Bakterienstämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in der Tabelle 2.1 aufgeführt. Die beiden verwendeten Referenzbakteriophagen sind der Tabelle 2.2 zu entnehmen. Sie wurden aus der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie und Biotechnologie des Max Rubner-Instituts, Kiel, entnommen.

Tabelle 2.1: Verwendete Stämme

Stamm	Spezies/Eigenschaften	Referenz
386	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Institutssammlung
263	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Institutssammlung
F7/2	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Andresen et al., 1984
Bu2	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Andresen et al., 1984
Bu2-60	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> plasmidfreies Derivat von Bu2	Neve et al., 1984
IL1403	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> (plasmidfrei)	Deveau et al., 2006
Wg2	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	Otto et al., 1982
3107	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	Brøndsted et al., 2001
MG1614	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	Gasson, 1980
554	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	Atamer et al., 2011
Ca41	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	Institutssammlung
BM2	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	Atamer et al., 2011
111	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	Institutssammlung
C008	<i>Ln. mesenteroides</i>	Atamer et al., 2011
1521	<i>Ln. mesenteroides</i>	Institutssammlung
123SL	<i>S. thermophilus</i>	Institutssammlung
S23	<i>S. thermophilus</i>	Institutssammlung
C4323	<i>S. thermophilus</i>	Institutssammlung
C4327	<i>S. thermophilus</i>	Institutssammlung
71	<i>S. thermophilus</i>	Institutssammlung

Tabelle 2.2: Verwendete Referenz-Bakteriophagen

Phage	Spezies	Morphologie/Typ	Referenz
P008	<i>L. lactis</i>	isodiametrischer Kopf / B1-Typ / 936-Spezies	Loof et al., 1983 Jarvis et al., 1989
P680	<i>L. lactis</i>	isodiametrischer Kopf / B1-Typ / 936-Spezies	Atamer et al., 2009

2.2.2 Enzyme und Primer

Tabelle 2.3: Enzyme mit mehrfacher Verwendung

Enzym	Zusammensetzung	Menge	
DNase	DNase	10	mg/ml
	Natriumacetat	20	mM
	CaCl ₂	5	mM
	pH 5,2		
RNase	RNase	10	mg/ml
	Tris-HCl	10	mM
	NaCl	15	mM
	pH 7,5		
Proteinase K	20 mg/ml Stammlösung		

Tabelle 2.4: Verwendete Restriktionsenzyme

Enzym	Sequenz	Puffer	Hersteller
HindIII	A↓AGCTT	Buffer R 1x	Fermentas, St.Leon-Rot
Eco321 (EcoRV)	GAT↓ATC	Buffer R 1x	Fermentas, St.Leon-Rot
PvuII	CAG↑CTG	Buffer G 1x	Fermentas, St.Leon-Rot

2.2.3 Nährmedien, Lösungen und Puffer

Die im Folgenden aufgelisteten Nährmedien, Lösungen und Puffer wurden mit zweifach entionisiertem Reinstwasser hergestellt (SG-Reinstwasser-System Clear, Barsbüttel). Die einzelnen Bestandteile wurden dabei mit Hilfe eines Magnetrührers gelöst und bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden durch einen Einwegfilter mit 0,2 µm Porengröße (s. Anhang, Tabelle A2) steril filtriert.

2.2.3.1 Allgemeine Lösungen und Puffer

Tabelle 2.5: Allgemeine Lösungen und Puffer

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung	Menge	
Ringerlösung (¼ stark)	Ringertabletten	2	Stk.
	rH ₂ O	ad 1000	ml
Verdünnungslösung	¼ starke Ringerlösung	900	ml
	10 % LM17-Medium	100	ml
	vor dem Gebrauch: 1 M CaCl ₂	1	ml
CaCl ₂ -Lösungen (1 M / 100 mM / 40 mM)	CaCl ₂ x 2H ₂ O	14,7/1,47/ 0,59	g
	rH ₂ O	ad 100	ml
Citratlösung	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x 2H ₂ O	20	g
	rH ₂ O	ad 1000	ml
	pH 7,5		
TE-Puffer (10x konz.) (Sambrook & Russell, 2001)	10,0 mM Tris-HCl	100	ml
	1,0 mM EDTA	10	ml
	pH 8,0		
PBS-Puffer	KCl	0,2	g
	KH ₂ PO ₄	0,2	g
	Na ₂ HPO ₄	1,15	g
	NaCl	8	g
Glycin (10 %)	Glycin	10	g
	rH ₂ O	ad 100	ml
Ethanol	70 % / 96 % unvergällt		

Tabelle 2.6: Lösungen und Puffer zur Phagen-DNA Extraktion

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Menge	
SM-Puffer (ohne Gelatine) (Sambrook & Russell, 2001)	NaCl	5,8	g
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	2	g
	1 M Tris-HCl (pH 7,5)	50	ml
	rH ₂ O	ad 1000	ml
	pH 7,5		
EDTA-Lösung	EDTA	0,5	M
	pH 8,0		

2.2.3.2 Nährmedien für *L. lactis*

Tabelle 2.7: Nährmedien für *L. lactis*

Medium/Lösung	Zusammensetzung	Menge	
M17 - Medium (LM17/GM17) (Terzaghi & Sandine, 1975)	Phytone-Peptone	5	g
	Poly-Peptone	5	g
	Yeast-Extrakt	2,5	g
	Beef-Extrakt	5	g
	Ascorbinsäure	0,5	g
	Lactose bzw. Glucose	5	g
	Na-β-Glycerophosphat	19	g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,25	g
	1 M CaCl ₂	1	ml
	rH ₂ O	ad 1000	ml
M17 - Oberschicht- Weichagar	Bacto-Agar	7,5	g
	Phytone-Peptone	5	g
	Poly-Peptone	5	g
	Yeast-Extrakt	2,5	g
	Beef-Extrakt	5	g
	Ascorbinsäure	0,5	g
	Na-β-Glycerophosphat	19	g
	1 M MgSO ₄	1	ml
	rH ₂ O	ad 1000	ml
M17 - Unterschichtagar*	LM17/GM17-Medium	940	ml
	Agar-Agar	1,5	%
	Zuckerlösung (Lactose/Glucose)	60	ml
Zuckerlösung für Unter- schichtagar (Krusch et al., 1987)	Lactose / Glucose	5	g
	1 M CaCl ₂	10	ml
	rH ₂ O	50	ml

* Die Zugabe von Lactose / Glucose erfolgte mit einer separat autoklavierten Lösung (siehe Zuckerlösung für Unterschichtagar).

2.2.3.3 Nährmedien für *Leuconostoc*

Tabelle 2.8: Nährmedien für *Leuconostoc*

Medium/Lösung	Zusammensetzung	Menge	
MRS-Medium (De Man et al., 1960)	MRS Medium	52,2	g
	rH ₂ O	ad 1000	ml
	pH 5,7		
MRS-Unterschichtagar	MRS Medium	52,2	g
	Agar-Agar	15	g
	rH ₂ O	ad 1000	ml
	pH 5,4		
MRS-Oberschicht-Weichagar	MRS Medium	52,2	g
	Agar-Agar	7,5	g
	rH ₂ O	ad 1000	ml
	pH 5,4		
HGL-Milch*	Magermilchpulver	100	g
	Glucose	10	g
	Yeast-Extrakt	3	g
	Kubel-Tiemanns-Lackmuslösung	25	ml
	rH ₂ O	ad 1000	ml

*Die HGL-Milch wurde für 30 min bei 100 °C an drei aufeinanderfolgenden Tagen tyndallisiert.

2.2.3.4 Nährmedien für *S. thermophilus*

Tabelle 2.9: Nährmedien für *S. thermophilus*

Medium/Lösung	Zusammensetzung	Menge	
thLM17 (Krusch et al., 1987)	Phytone-Peptone	5	g
	Poly-Peptone	5	g
	Yeast-Extrakt	2,5	g
	Beef-Extrakt	5	g
	Ascorbinsäure	0,5	g
	Lactose	8	g
	Na-β-Glycerophosphat	9,5	g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,25	g
	1 M CaCl ₂	1,2	ml
	rH ₂ O	ad 1000	ml
thLM17 - Oberschicht- Weichagar	Bacto-Agar	6	g
	Phytone-Peptone	2,4	g
	Poly-Peptone	2,4	g
	Yeast-Extrakt	2	g
	Beef-Extrakt	3,3	g
	Caseinhydrolysat	2,4	g
	Ascorbinsäure	0,4	g
	Na-β-Glycerophosphat	12,7	g
	1 M MgSO ₄	1,3	ml
	entwässerte Ellikerbroth	16	g
	rH ₂ O	ad 1000	ml
thLM17 - Unterschichtagar	LM17/GM17-Medium	940	ml
	Agar-Agar	1,5	%
	Lactose	60	ml
	vor dem Gebrauch: 0,1 % Glycin		
Magermilch*	Magermilchpulver	100	G
	rH ₂ O	900	ml

* Die Magermilch wurde für 30 min bei 100 °C an drei aufeinanderfolgenden Tagen tyndallisiert.

2.2.4 Kultivierung der Stämme

Die Anzucht der *L. lactis* und *Leuconostoc* Stämme erfolgte bei 30 °C in Nährmedien. Die Lactose-verwertenden *L. lactis* Stämme wurden in M17-Flüssigmedium unter Zugabe von Lactose (LM17), die Lactose-negativen Stämme in M17-Flüssigmedium unter Zusatz von Glucose (GM17) kultiviert (Tabelle 2.7). Die Anzucht der *Leuconostoc* Stämme erfolgte in MRS-Medium (Tabelle 2.8). Die thermophilen *S. thermophilus* Stämme wurden im modifizierten M17-Medium speziell für thermophile Bakterien kultiviert und bei 37 °C inkubiert (Tabelle 2.9).

Der Einsatz der Bakterienstämme erfolgte ausschließlich als Tageskultur. Dazu wurden 5 ml des Flüssigmediums 2 %ig mit einer spätlogarithmischen Bakterienkultur (Über-Nacht-Kultur) beimpft und bis zu einer $OD_{620\text{ nm}}$ von 0,5 bei 30 °C bzw. 37 °C inkubiert.

2.2.5 Langzeitlagerung der Stämme

Die Dauerkulturen der *L. lactis* und *S. thermophilus* Stämme wurden in M17-Medium mit Zusatz von Glycerin hergestellt. Dazu wurden 850 µl der entsprechenden Über-Nacht-Kultur mit 150 µl Glycerin (85 %) versetzt und bei -80 °C eingefroren. Die *Leuconostoc* Stämme wurden zuerst 2 %ig in Lackmusmilch überimpft, 3 h bei 30 °C bebrütet und anschließend in einem Kryoröhrchen bei -80 °C aufbewahrt.

Die Lagerung der Phagenlysate erfolgte ebenfalls unter Zugabe von 10 %igen Glycerin bei -80 °C.

2.2.6 Phagennachweis und Titerbestimmung

2.2.6.1 Aufarbeitung der Proben

Um die Molkenpulverproben zu resuspendieren, wurde das Pulver mit unterschiedlicher Volumina Citratlösung versetzt. Aufgrund der heterogenen Löslichkeit der Molkenpulverproben variierte das Verhältnis von Pulver zu Citratlösung zwischen 2:5 – 1:10. Nach dem vollständigen Lösen des Pulvers mit Hilfe eines Magnetrührers wurden 30 ml der Lösung mit 900 µl einer 10 %igen Milchsäure versetzt und unter leichtem Schütteln 30 min angesäuert. Anschließend wurde die Lösung 20 min bei 4 °C und 12000 rpm zentrifugiert (Beckman Coulter J2-21 Zentrifuge; Rotor: JA-20) und der Überstand durch einen 0,45 µm Porenfilter (s. Anhang, Tabelle A2) steril filtriert.

2.2.6.2 Spotttest

Mit dem Spotttest erfolgte der Nachweis und die Identifizierung von Phagen in den Überständen der Molkenpulverlösungen. Dabei wurden 100 µl einer 40 mM CaCl_2 -Lösung mit 300 µl der jeweiligen Bakterien-Tageskultur versetzt und mit 3 ml auf ca. 50 °C temperierten Oberschicht-Weichagar vermischt (bei den *S. thermophilus* Stämmen wurden zusätzlich 0,1 % Glycin und 100 µl Magermilch hinzugefügt). An-

schließlich wurde der Ansatz auf einer M17- bzw. MRS-Unterschichtagarplatte ausgegossen und gleichmäßig verteilt. Nach ca. 2 min wurden 100 µl der sterilen Molkenpulverlösung auf die Platte gespottet und anschließend für 16-20 h bei 30 °C (*L. lactis* und *Leuconostoc* Phagen) bzw. 37 °C (*S. thermophilus* Phagen) inkubiert.

2.2.6.3 Plaquetest

Der Plaquetest (Adams, 1959) wurde zur quantitativen Bestimmung der Phagen in Molkenpulver eingesetzt. Dabei wurde zuerst eine serielle Verdünnungsreihe erstellt, wobei im ersten Schritt stets 0,5 ml Molkenpulverlösung mit 4,5 ml Verdünnungslösung versetzt und bis zur benötigten Verdünnungsstufe fortgeführt wurde. Anschließend wurden 100 µl 40 mM CaCl₂ mit je 100 µl jeder Verdünnungsstufe und 300 µl Bakterien-Tageskultur versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Nach einer 10-min Adsorptionszeit wurden den Ansätzen je 3 ml des zuvor erhitzten Oberschicht-Weichagar hinzugegeben und auf einer Unterschichtagarplatte ausplattiert. Bei dem Plaquetest für *Leuconostoc* Phagen wurden dem MRS-Unterschichtagar zusätzlich 10 mM CaCl₂ und dem MRS-Oberschicht-Weichagar 0,3 ml 100 mM CaCl₂ hinzugegeben. Wurde der Plaquetest mit den *S. thermophilus* Phagen durchgeführt, so wurde der Oberschicht-Weichagar zusätzlich mit 0,1 ml Magermilch versetzt. Die Inkubation der Platten erfolgte für 16-20 h bei 30 °C (*L. lactis* und *Leuconostoc* Phagen) bzw. 37 °C (*S. thermophilus* Phagen). Anschließend konnten die Einzelplaques ausgezählt und so die Konzentration der Phagen als Plaque-bildende Einheiten (PbE) bestimmt werden.

2.2.7 Phagenanzucht

Um die Konzentration der Phagen zu erhöhen, wurden diese über die sog. lytische Anzucht vermehrt. Dazu wurden 100 µl 40 mM CaCl₂ mit 100 µl Phagenlysat und 250 µl des jeweiligen Wirtsstammes versetzt. Dabei kamen unverdünnte Lysate, aber auch Lysate bis zu einer Verdünnung von 10⁻⁷ zum Einsatz. Nach einer Adsorptionszeit von 10 min wurden 5 ml des entsprechenden Flüssignährmediums hinzugegeben und die Ansätze in einem Wasserbad bei 30 °C bzw. 37 °C inkubiert. Das Wachstum bzw. das Lyseverhalten der Bakterien und Phagen wurden alle 30 min mit Hilfe eines Photometers bei 620 nm dokumentiert. Ansätze mit optimaler Lyse (z.B.

Abfall der OD_{620 nm} von 1,0 auf 0,1) wurden zusammengefügt und steril filtriert (0,45 µm Porenfilter).

2.2.8 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) der Phagen

Die Elektronenmikroskopie wurde zur Visualisierung der Phagenmorphologie und zum Nachweis intakter Phagen in Lysaten eingesetzt. Um die TEM-Präparate herstellen zu können, wurde im ersten Schritt frisch gespaltene Glimmerplatten (Plano GmbH, Wetzlar) mit reiner Kohle mittels der Bedampfungsanlage BAL-TEC MED 020 (Balzers, Lichtenstein) bedampft. Diese Glimmerplatten wurden anschließend in kleine Stücke (ca. 3 x 3 mm) mittels einer Skalpellklinge geschnitten. Durch das Eintauchen der bedampften Glimmerplatte in einen 80 µl Tropfen Phagenlysat wurde der Kohlefilm von der Platte abgelöst. Während der 5-min Adsorptionszeit konnten die Phagen an dem Kohlefilm adsorbieren und wurden anschließend in zwei Tropfen rH₂O gewaschen und in 80 µl 2 %iger Uranylacetatlösung (Agar Scientific, Stansted, England) an dem Kohlefilm fixiert. Das Uranylacetat diente der Negativkontrastierung des Präparats, wodurch die Phagen im TEM sichtbar gemacht wurden. Anschließend wurde der Kohlefilm mit einem 400-„mesh“ Kupfernetzchen (Plano GmbH, Wetzlar) aufgenommen und mittels Filterpapier das überschüssige Uranylacetat entfernt.

Die Präparate wurden in einem Tecnai 10 Transmissionselektronenmikroskop (FEI Company, Eindhoven, Niederlande) bei 80 kV Beschleunigungsspannung analysiert. Die Erfassung der Phagenbilder erfolgte mittels einer CCD-Kamera (Megaview G2 CCD-Kamera (SIS Olympus, Münster)) bei einer hohen Primärvergrößerung von bis zu 210.000x. Die Bearbeitung der Bilder fand mit der iTEM 5.2 TEM Imaging Platform Software (SIS Olympus, Münster) statt.

2.2.9 Phagen-DNA-Isolierung aus Bakterienrasen mit konfluenter Lyse

Fünf Agar-Platten mit einem Bakterienrasen mit konfluenter Lyse wurden mit je 5 ml SM-Puffer benetzt und für 3 Stunden bei RT leicht geschüttelt. Anschließend wurde die Puffer-Phagen-Suspension von den Platten abgenommen, steril filtriert (0,45 µm Porenfilter) und zu je 1 ml in Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Aliquots wurden bei 14.000 rpm und 4 °C für 1 h zentrifugiert (Eppendorf 5417R; Rotor: FA 45-30-11) und die Pellets in insgesamt 1 ml M17-Bouillon, versetzt mit 10 % 40 mM CaCl₂, resuspendiert. Anschließend wurden die Pellets mit je 2 µl DNase und RNase (10 mg/ml)

versetzt und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Eine erneute Zentrifugation der Ansätze erfolgte bei 14.000 rpm und 4 °C für 2 h (Eppendorf 5417R; Rotor: FA 45-30-11). Der Überstand wurde verworfen, die Pellets für 15 min bei RT stehen gelassen und schließlich in 500 µl TE-Puffer aufgenommen.

Der DNA-Aufschluss erfolgte am folgenden Tag, indem das in TE-Puffer gelöste Pellet mit 50 µl 200 mM EDTA (pH 8), 1,3 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 12,5 µl 20 % SDS versetzt und bei 37 °C für 3 h inkubiert wurde. Danach wurde die DNA auf RT runtergekühlt und durch Phenol- und Chloroform-Isoamylalkohol (24:1)-Extraktion von Zelltrümmern und Proteinen gereinigt. Dazu wurde die DNA mit 1 Volumen Phenol versetzt, 30 x invertiert und bei 14.000 rpm für 5 min zentrifugiert (VWR, Galaxy 14D). Nach Abnehmen der wässrigen Phase (oben) wurde die Phenolextraktion wiederholt. Der wässrige Überstand wurde mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol vermischt, 30 x invertiert und wie oben angegeben abzentrifugiert. Auch dieser Schritt wurde wiederholt. Der abgenommene Überstand wurde anschließend mit 1 Volumen Isopropanol versetzt, die DNA eine Stunde bei -20 °C gefällt und bei 14.000 rpm und 4 °C für 15 min abzentrifugiert (Eppendorf 5417R; Rotor: FA 45-30-11). Das so gewonnene Pellet wurde mit 1 Volumen 70 %igem Ethanol gewaschen, wie eben beschrieben abzentrifugiert und die DNA-Pellets in 10 µl TE-Puffer resuspendiert.

2.2.10 Restriktionshydrolyse der DNA

Für die Restriktionshydrolyse wurde die DNA mit 1 Unit eines geeigneten Restriktionsenzym und des entsprechenden Reaktionspuffers versetzt und bei 37 °C für drei Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Fragmente durch eine elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel überprüft.

2.2.11 Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der Phagen-DNA-Fragmente wurde in 0,8 %igem Agarosegel durchgeführt (Sambrook & Russell, 2001). Dabei wurde die Agarose 0,8 %ig in 1x TAE-Puffer aufgenommen, in einer Mikrowelle durch Aufkochen gelöst und anschließend als Agarose-Gel gegossen. Die DNA-Proben (10 µl) wurden mit 2 µl 6x Ladepuffer „Dye“ versetzt, auf das Gel aufgetragen und elektrophoretisch bei 95 V für 5 min und anschließend bei 75 V für 40 min getrennt. Als

Größenstandard (Marker) wurde λ -DNA, HindIII geschnitten (AppliChem GmbH, Darmstadt) aufgetragen.

Die Visualisierung der DNA erfolgte, indem das Agarosegel 10 min in einem Ethidiumbromid-Bad (1 $\mu\text{g/ml}$) gefärbt und anschließend 15 min in rH_2O entfärbt wurde. Die Dokumentation der Gele wurde mit der Biorad ChemiDoc™ XRS-Anlage, Software: Quantity One™ 4.5.2 durchgeführt.

Tabelle 2.10: Lösungen und Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

Medium/Lösung	Zusammensetzung	Menge	
TAE-Puffer (50x konz.) (Sambrook & Russell, 2001)	Tris-HCl	242	g
	Eisessig	57,1	ml
	0,5 M EDTA	100	ml
	rH_2O	ad 1000	ml
	pH 8		
DNA-Probenpuffer (-Dye-) (Sambrook & Russell, 2001)	Bromphenolblau	0,25	%
	Glycerin	33	%
Agarosegel (0,8 % / 1,5 %)*	Agarose	0,8 / 1,5	g
	TAE-Puffer	100	ml

* Das Agarosepulver wurde mit TAE-Puffer versetzt und durch das Aufkochen (ca. 3 min) in einer Mikrowelle (haushaltsüblich) gelöst, dabei immer wieder zwischendurch geschwenkt.

2.2.12 Thermische Inaktivierung der Phagen

Zur thermischen Inaktivierung der Phagen wurden hochtitrige Phagenlysate eingesetzt. Die Erhitzung erfolgte dabei in speziellen Edelstahlröhrchen (Länge 5 cm, Außendurchmesser 1 cm, Innenvolumen 1,5 ml) mit einem Schraubdeckel an jedem Ende, um einen blasen- und luftfreien Einschluss der Flüssigkeit zu gewährleisten (Abb. 2.1). Die Phagenlysate (0,1 ml) wurden in 1,4 ml dest. Wasser bzw. Magermilch (0,1 % Fett) suspendiert und in die Edelstahlröhrchen überführt. Diese wurden fest verschraubt und im Eiswasser bei 4 °C gekühlt. Die Erhitzung erfolgte im Wasserbad bei Temperaturen von 80 bis 97,5 °C und einer Heizhal-



Abb. 2.1: Edelstahlröhrchen zur Phagenerhitzung.

tezeit von 1 bzw. 5 min. Dazu wurden die Röhrchen parallel in ein Wasserbad eingetaucht, wo sie nach 1 min ‚Aufheizphase‘ dieselbe Temperatur wie das umgebende

Wasser erreichten. Nach 1 bzw. 5 weiteren Minuten ‚Heißhaltezeit‘ wurden die Röhrchen aus dem Wasserbad entnommen und sofort im Eisbad auf 4 °C gekühlt. Das erste Röhrchen (nach 1 min ‚Aufheizphase‘) diente als Anfangstiter, die Röhrchen nach 1 bzw. 5 min Erhitzung dienten zur Erfassung der Titerreduktion durch den Nachweis der aktiven Phagen im Suspensionsmedium. Für jeden Phagen wurde eine dreifache Bestimmung durchgeführt. Der Phagentiter wurde mittels Plaquetest bestimmt. Im Falle eines Phagennachweises wurde die Temperatur in 5 °C-Schritten erhöht und die thermische Inaktivierung mit unerhitzter Phagensuspension wiederholt.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Isolierung und Charakterisierung der Bakteriophagen

Die Isolierung und Charakterisierung der Bakteriophagen aus den Molkenpulverproben wurde bereits in der Masterarbeit mit dem Titel „Nachweis und Typisierung von Bakteriophagen der Milchsäurebakterien in Molkenpulver und Molkenpulverformulierungen“ (Wagner, 2012) durchgeführt. Insgesamt wurden 55 Phagen isoliert, darunter 33 *L. lactis*, 13 *Ln. pseudo-/mesenteroides* und 9 *S. thermophilus* Phagen. Die 10 Molkenpulverformulierungen, aus denen die Phagen isoliert wurden, wurden aus lokalen Supermärkten bezogen, während die 13 reinen Molkenpulver ursprünglich von verschiedenen Molkereien und milchverarbeitenden Betrieben stammen. Die höchsten Phagentiter in den Proben lagen im Bereich von 6×10^7 PbE/g für *L. lactis* Phagen, 1×10^7 PbE/g für *Ln. pseudo-/mesenteroides* Phagen und 1×10^4 PbE/g für *S. thermophilus* Phagen. Die relevanten Charakteristika der Bakteriophagen sind in der Tabelle 2.11 dargestellt.

Tabelle 2.11: Charakteristika und Wirtsspektren der Phagen aus Molkenpulverproben. MF: Molkenpulverformulierungen; MP: Molkenpulver

Quelle	Phage	Phagen- gruppe	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>				<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>				<i>Ln. pseudo-mesenteroides</i>				<i>Ln. mesen.</i>		<i>S. thermophilus</i>				
			Bu2-60	IL 1403	F7/2	386	263	Wg2	3107	MG 16	554	Ca41	BM2	111	C008	1521	Moz12	S23	4323	4327	71
MF1	P955	936	•	•	•	•															
MF2	P956	936	•	•	•																
MF3	P957	936	•	•																	
	P975	936						•	•												
MF4	P958	936	•	•	•	•															
	P989	936						•	•												
	P973	A1									•	•									
	P1011	cos															•			•	
MF5	P959	936	•	•	•																
MP1	P951	P335					•	•	•												
	P994	P335						•	•												
MP2	P978	936	•	•	•	•															
	P976	936						•													
	P988	A1									•	•									
	P1010	cos																•			
MP3	P993	936	•	•																	
	P981	936						•	•												
MP4	P960	936	•	•	•	•															
	P985	936						•	•												
	P972	A1									•	•									
	P1012	cos															•			•	
MP5	P961	936	•	•		•															
	P977	936						•	•												
	P971	A1									•	•									
	P968	A2											•	•							
	P1013	cos															•			•	
MP6	P963	936	•	•																	
	P986	936						•	•												
	P970	A1									•	•									
	P967	A2											•	•							
	P965	A2											•	•							
	P1014	cos															•			•	
MP7	P962	936	•	•	•	•															
	P984	936						•	•												
	P969	A1									•	•									
	P966	A1/2									•	•	•	•							
	P964	A2											•	•							
	P974	B											•	•	•	•					
MP8	P1009	cos															•			•	
	P979	936	•	•	•	•															
MP9	P1005	936						•	•												
	P980	936	•	•		•															
MP10	P982	936					•	•	•												
	P1016	cos																•			
MP11	P1007	936	•	•	•	•															
	P1004	936						•	•												
MP12	P983	936	•	•																	
	P1006	936						•	•												
	P987	A1									•	•									
MP13	P1008	cos															•			•	
	P990	936		•																	
MP14	P992	936								•											
	P991	936	•																		
	P1003	936					•	•	•												
MP15	P1017	cos																			•

Insgesamt wurden in allen 13 Molkenpulvern und in 5 Molkenpulverformulierungen Phagen nachgewiesen. Auffällig ist, dass Phagen gegen die *L. lactis* Wirtsstämme in allen Molkenpulverproben und in 5 der 10 Molkenpulverformulierungen detektiert wurden. Eine besonders hohe Phagenvielfalt wurde in der Molkenpulverprobe 7 festgestellt, die sowohl Phagen gegen die mesophilen (*L. lactis* und *Leuconostoc*) als auch gegen die thermophilen (*S. thermophilus*) Bakterien enthielt (Tabelle 2.11). Dies war auch die einzige Probe, in der ein *Ln. mesenteroides* Phage nachgewiesen wurde. Phagen gegen alle drei Bakterienspezies wurden ebenfalls in der Molkenformulierung 4 und in den Molkenpulvern 2, 4, 5, 6 und 11 festgestellt.

Die Zuordnung der Phagen zu den einzelnen Phagengruppen erfolgte mithilfe der PCR (hier nicht gezeigt, Wagner et al., 2017), während die Wirtsspektren der Phagen mittels Kreuzspotttest ermittelt wurden. Wie der Tabelle 2.11 zu entnehmen ist, zeigten die *L. lactis* Phagen klar abgegrenzte Wirtsspektren der beiden *L. lactis* Subspezies. Während 17 *L. lactis* Phagen lediglich die *L. lactis* ssp. *lactis* Stämme lysierten, konnten 16 *L. lactis* Phagen nur die *L. lactis* ssp. *cremoris* Stämme infizieren. Das Wirtsspektrum der *Leuconostoc* Phagen werden in mehrere Spektren unterteilt - Spektren A1 und A2 für *Ln. pseudomesenteroides* und B1 und B2 für *Ln. mesenteroides* Phagen. Von den 12 in der Arbeit isolierten *Ln. pseudomesenteroides* Phagen zeigten 7 Phagen das Spektrum A1, während 4 Phagen das Spektrum A2 aufwiesen. Lediglich ein Phage (P966) war in der Lage, Stämme beider Spektren zu lysieren. Der einzige *Ln. mesenteroides* Phage P974 zeigte dabei das Wirtsspektrum B1. Von den neun *S. thermophilus* Phagen konnten sechs Phagen zwei *S. thermophilus* Stämme (Moz12 und 4327) infizieren, während die übrigen drei Phagen lediglich den *S. thermophilus* Stamm lysieren konnten, der zu ihrer Isolierung diente.

Zusätzlich zu der Bestimmung der Phagengruppe und der Wirtsspektren wurden die Phagenisolate mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Wie in der Abbildung 2.2 zu sehen, zeigte die Mehrzahl (31 von 33) der *L. lactis* Phagen die für die *Siphoviridae* Phagen typische Morphologie – isodiametrischer Kopf mit einem Durchmesser zwischen 53 nm (P993) und 60,2 (P963) nm und eine Schwanzlänge zwischen 136,7 nm (P1003) und 162,9 nm (P982). Lediglich der Phage P1005 unterschied sich mit einer Schwanzlänge von 181,4 nm deutlich von den übrigen *L. lactis* Phagen. Zwei der 33 *L. lactis* Phagen (P951 und P994) wurden sowohl mithilfe der PCR (nicht gezeigt) als auch morphologisch der P335 Phagengruppe zugeordnet. Diese Gruppe ist durch eine hohe Heterogenität gekennzeichnet, was sich auch für

diese beiden morphologisch sehr unterschiedlichen Phagen bestätigte. Während beide Phagen einen ähnlichen Kopfumfang (P994 – 60,4 nm und P951 – 58,3 nm) zeigten, unterschieden sie sich stark in der Schwanzlänge (P994 – 144,4 nm und P951 – 249,1 nm) sowie den Strukturen der Basisplatte bei dem Phagen P994 (Abb. 2.2).

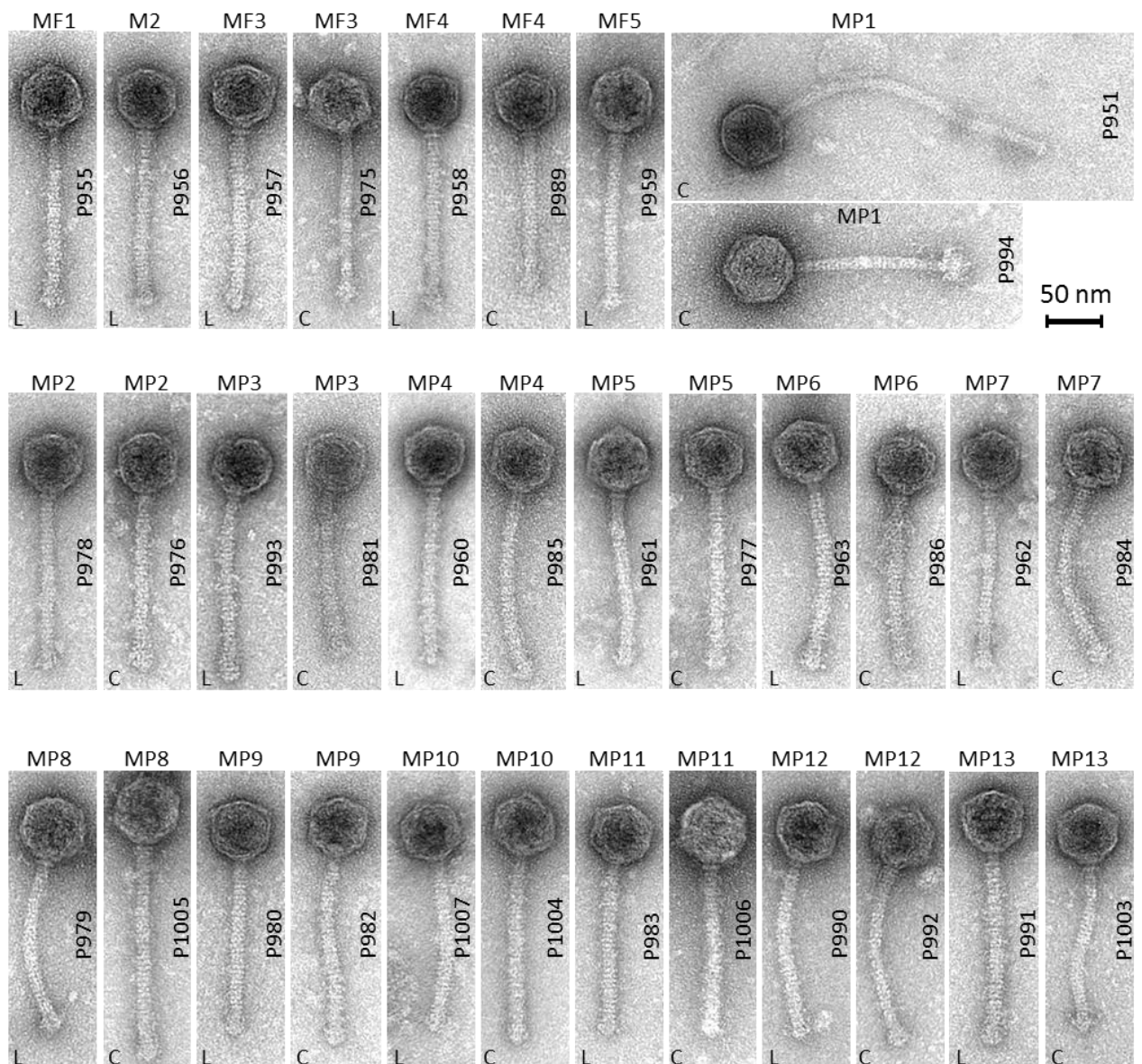


Abb. 2.2: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der *L. lactis* Phagen isoliert aus verschiedenen Molkenpulverformulierungen (MF) und Molkenpulvern (MP). L: *L. lactis* ssp. *lactis*; C: *L. lactis* ssp. *cremoris*.

Die Morphologie der *Leuconostoc* Phagen ist in der Abbildung 2.3a für 8 der 13 Phagen exemplarisch dargestellt. Alle Phagen wiesen einen für die *Leuconostoc* Phagen typischen Aufbau mit einem Kopfdurchmesser von ca. 55 nm und einer Schwanzlänge

ge von ca. 140 nm auf. Die einzigen Unterschiede zeigten sich bei diesen Phagen in dem Aufbau der Basisplatten. Es wurden sowohl Phagen mit einem Kragen und ebenen Basisplatten des Typs IIa (P972 & P965), als auch Phagen mit „flauschigen“ Basisplattenstrukturen des Typs IIc detektiert (P966). Bei dem *Ln. pseudomesenteroides* Phagen P968 wurden dagegen kugelförmige Basisplattenstrukturen detektiert werden, die bis dato lediglich bei *Ln. mesenteroides* Phagen beobachtet wurden. Die *S. thermophilus* Phagen (in der Abb. 2.3b für zwei repräsentative Phagen gezeigt) zeigten ebenfalls eine einheitliche Morphologie mit einem Kopfdurchmesser zwischen 54-60 nm und einer Schwanzlänge von ca. 240 nm.

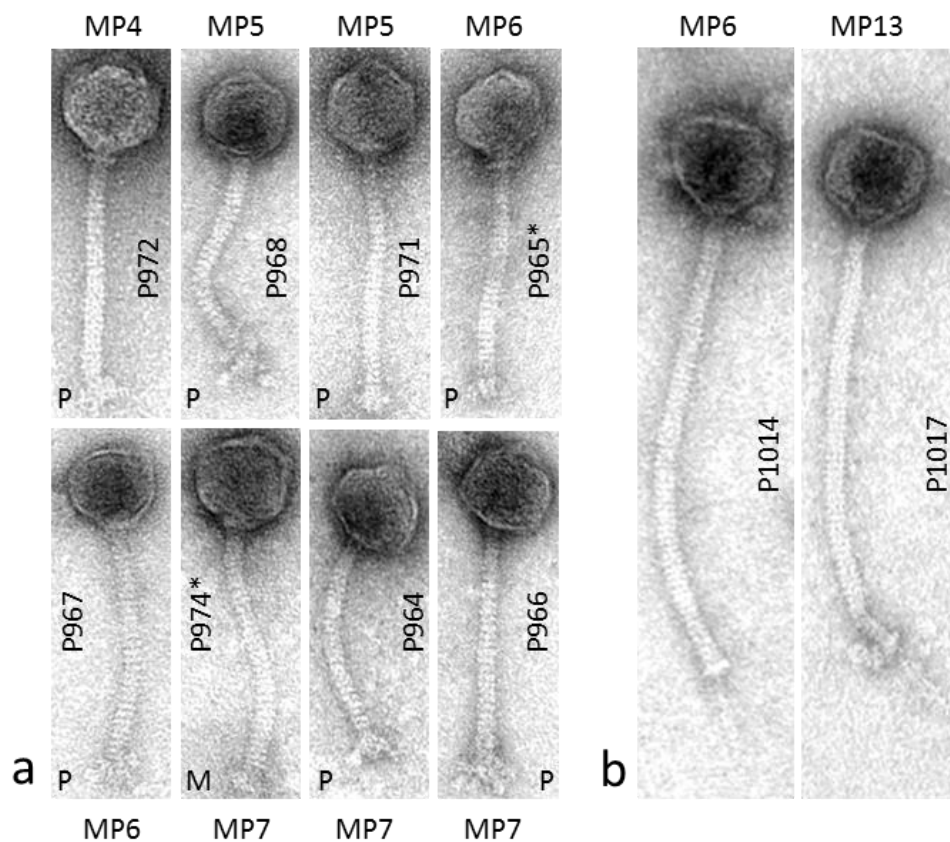


Abb. 2.3: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der *Leuconostoc* Phagen (a) und einer repräsentativen Auswahl der *S. thermophilus* Phagen (b) isoliert aus verschiedenen Molkenpulvern (MP). P: *Ln. pseudomesenteroides*; M: *Ln. mesenteroides*

Um die biologische Diversität der *L. lactis* Phagen zu überprüfen, wurden von den meisten dieser Phagen (31) Restriktionsverdaus mittels Eco321 angefertigt. Die Verdauemuster sind in der Abbildung 2.4 gezeigt. Für den Großteil der Phagen konnten unterschiedliche Muster erzeugt werden. Selbst Phagen aus Proben (MP5 mit P961 und P977 und MP6 mit P963 und P986), die vom gleichen milchverarbeitenden Betrieb, jedoch an verschiedenen Produktionstagen gesammelt wurden, zeigten deut-

lich unterscheidbare Restriktionsmuster. Dagegen wurden bei zwei weiteren Proben (MP9 und MP10), die ebenfalls aus dem gleichen Betrieb bezogen wurden, identische Verdauemuster für die *L. lactis* ssp. *lactis* Phagen P980 (MP9) und P1007 (MP10) und die *L. lactis* ssp. *cremoris* Phagen P982 (MP9) und P1004 (MP10) festgestellt.

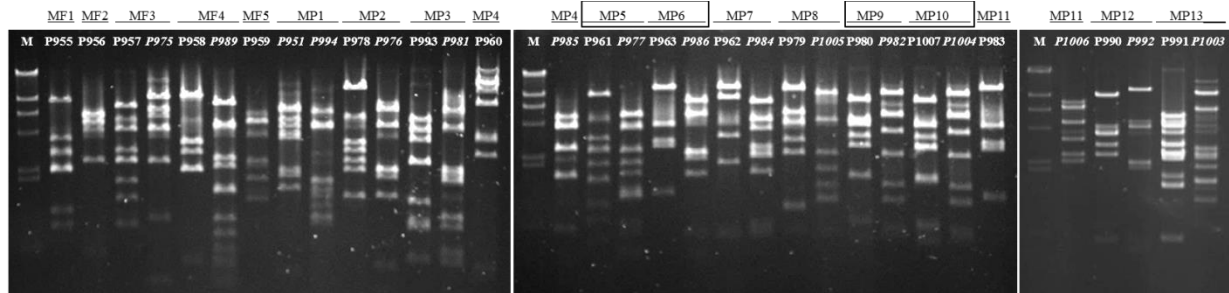


Abb. 2.4: DNA-Restriktionsverdau (0.8 % Agarosegel) der 33 *L. lactis* Phagen isoliert aus 5 Molkenpulverformulierungen (MF1-5) und aus 13 Molkenpulvern (MP1-13). M: Größenstandard λ /HindIII, Enzym: Eco321.

2.3.2 Screening auf die Hitzestabilität der Phagen

Das Thermoresistenzscreening wurde mit 32 *L. lactis* Phagen in UHT-Magermilch durchgeführt. Die Abbildung 2.5 zeigt die Titerreduktion der Phagen nach der Erhitzung bei 80 °C und einer Heißhaltezeit von (a) 1 bzw. (b) 5 min. Die Balken zeigen den Anfangstiter der Phagen nach 1 min Aufheizphase und den Endtiter nach der Erhitzung. Die Detektionsgrenze lag bei 10^0 PbE/ml.

Drei der 32 Phagen (P951, P994 und P1003) wurden bereits nach 1 min Erhitzung bei 80 °C komplett inaktiviert. Eine Verlängerung der Heißhaltezeit auf 5 min führte zur Titerreduktion eines weiteren Phagen, P985, auf unter 10^1 PbE/ml. Die restlichen Phagen, die nach der Erhitzung bei 80 °C immer noch aktiv waren, wurden anschließend einer thermischen Behandlung bei höheren Temperaturen unterzogen (siehe Tabelle 2.11). Zehn der 32 *L. lactis* Phagen waren noch in der Lage, nach einer Erhitzung bei 85 °C und einer Heißhaltezeit von 5 min Plaques zu bilden. Eine Steigerung der Temperatur auf 90 °C führte nach einer 5-min Erhitzung zur Inaktivierung weiterer fünf Phagen. Von den übrigen fünf Phagen hatten vier Phagen (P956, P963, P983, P959) eine Temperatur von 95 °C für 5 min mit einer Titerreduktion zwischen 2,3 bis 3 log-Stufen überstanden (Tabelle 2.12).

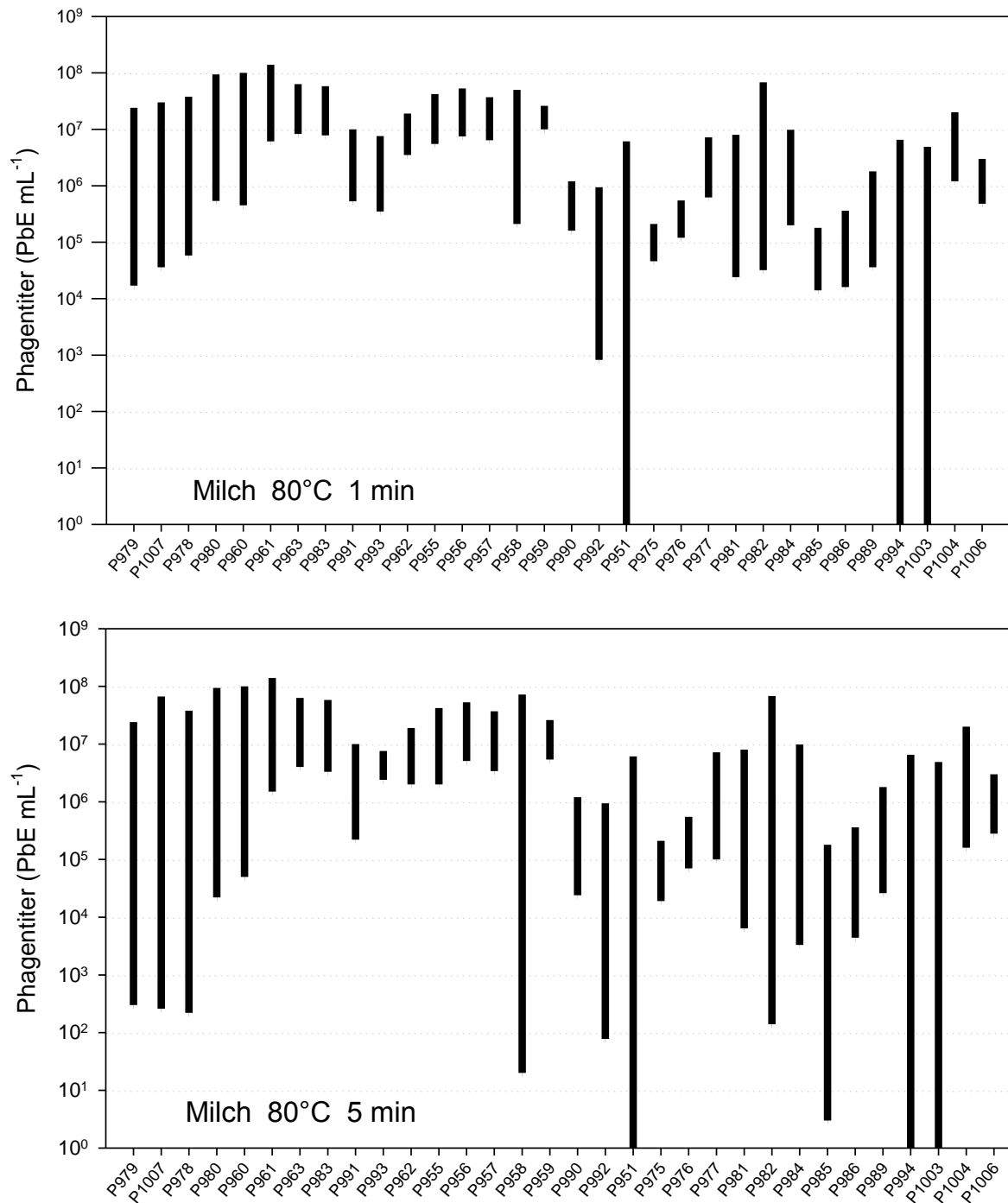


Abb. 2.5: Inaktivierung der 32 *L. lactis* Phagen nach 1-min (A) und 5-min (B) Hitzebehandlung in Milch bei 80 °C.

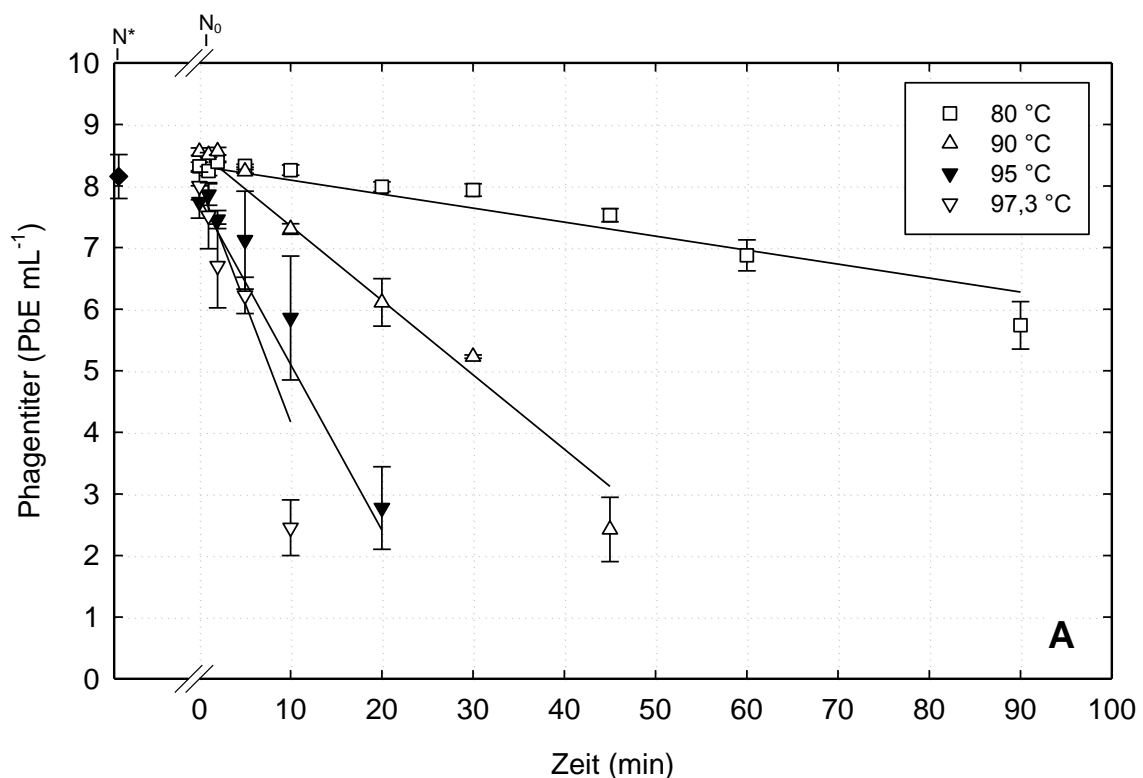
Tabelle 2.12: Thermische Inaktivierung der *L. lactis* Phagen bei unterschiedlichen Temperaturen und einer Heißhaltezeit von 1 und 5 min.

Phage	unerhitzt	1 min					5 min				
		80 °C	85 °C	90 °C	95 °C	99 °C	80 °C	85 °C	90 °C	95 °C	99 °C
P979	$2,4 \times 10^7$	$1,2 \times 10^4$	-				$2,0 \times 10^2$	-			
P1007	$4,8 \times 10^7$	$2,7 \times 10^4$	-				$4,4 \times 10^1$	-			
P978	$3,8 \times 10^7$	$4,1 \times 10^4$	-				$1,5 \times 10^2$	-			
P980	$1,9 \times 10^8$	$3,6 \times 10^5$	-				$1,5 \times 10^4$	-			
P960	$1,0 \times 10^8$	$4,5 \times 10^5$	-				$3,4 \times 10^4$	-			
P961	$7,5 \times 10^7$	$3,0 \times 10^6$	$1,3 \times 10^4$	-			$1,2 \times 10^6$	$4,3 \times 10^3$	-		
P963	$2,8 \times 10^8$	$8,3 \times 10^6$	$5,2 \times 10^6$	$6,6 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$	-	$4,0 \times 10^6$	$7,3 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	-
P983	$9,3 \times 10^7$	$7,8 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$9,7 \times 10^5$	-	$3,3 \times 10^6$	$8,6 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	-
P991	$1,4 \times 10^7$	$5,3 \times 10^5$	$6,8 \times 10^2$	-			$1,6 \times 10^5$	-			
P993	$9,8 \times 10^6$	$3,5 \times 10^5$	$1,6 \times 10^4$	-			$2,4 \times 10^5$	$1,7 \times 10^3$	-		
P962	$2,4 \times 10^7$	$2,9 \times 10^6$	$2,5 \times 10^5$	-			$1,3 \times 10^6$	-			
P955	$4,5 \times 10^7$	$5,5 \times 10^6$	-				$2,0 \times 10^6$	-			
P956	$6,6 \times 10^7$	$3,6 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	-	$1,0 \times 10^7$	$4,3 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$4,5 \times 10^5$	-
P957	$3,6 \times 10^7$	$6,4 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,6 \times 10^5$	-	$3,4 \times 10^6$	$7,1 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	-	
P958	$7,2 \times 10^7$	$1,4 \times 10^5$	-				$2,0 \times 10^1$	-			
P959	$2,7 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	$6,3 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$4,1 \times 10^5$	-	$5,4 \times 10^6$	$9,2 \times 10^5$	$5,4 \times 10^5$	$2,6 \times 10^4$	-
P990	$1,2 \times 10^6$	$1,3 \times 10^5$	-				$2,4 \times 10^4$	-			
P992	$9,4 \times 10^5$	$6,1 \times 10^2$	-				$5,4 \times 10^1$				
P951	$5,0 \times 10^6$	-					-				
P975	$2,5 \times 10^5$	$4,6 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	-			$1,9 \times 10^4$	$2,8 \times 10^2$	-		
P976	$4,3 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$2,7 \times 10^3$	-			$7,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^2$	-		
P977	$5,4 \times 10^6$	$7,5 \times 10^5$	$4,0 \times 10^1$	-			$3,6 \times 10^5$	-			
P981	$3,1 \times 10^6$	$5,3 \times 10^4$	$2,7 \times 10^2$	-			$6,4 \times 10^3$	-			
P982	$6,8 \times 10^7$	$3,2 \times 10^4$	-				$4,9 \times 10^2$	-			
P984	$9,8 \times 10^6$	$2,1 \times 10^5$	-				$3,3 \times 10^3$	-			
P985	$1,8 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4$	-				$2,7 \times 10^0$	-			
P986	$3,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^4$	$1,4 \times 10^2$	-			$3,1 \times 10^3$	-			
P989	$1,8 \times 10^6$	$3,6 \times 10^4$	-				$4,9 \times 10^4$	-			
P994	$6,5 \times 10^6$	-					-				
P1003	$4,9 \times 10^6$	-					-				
P1004	$4,7 \times 10^7$	$9,7 \times 10^5$	-				$1,6 \times 10^5$	-			
P1006	$2,3 \times 10^6$	$4,8 \times 10^5$	$2,7 \times 10^4$	-			$2,8 \times 10^5$	$7,6 \times 10^3$	-		

2.3.3 Inaktivierungskinetik der thermostabilen Bakteriophagen

Zur Bestimmung der Inaktivierungskinetik wurde der thermostabilste *L. lactis* Phage P956 ausgewählt. Um den Einfluss des Umgebungsmediums während der Erhitzung zu untersuchen, wurde der Phage bei unterschiedlichen Temperaturen für bis zu 90 min in Magermilch und dest. Wasser erhitzt. Wie der Abbildung 2.6A zu entnehmen ist, konnte der Phage P956 eine thermische Behandlung in Milch bei 90 °C für 40 min überstehen. Selbst nach einer Erhitzung bei 95 °C für 20 min bzw. 97,3 °C für 10 min konnte der Phage immer noch Plaques bilden.

Eine höhere thermische Sensitivität zeigte der Phage P956 im Wasser, wie anhand der Inaktivierungskurven in der Abbildung 2.6B zu sehen ist. Während der Titer des Phagen P956 in der Milch nach einer 90-min Erhitzung bei 80 °C um 2,3 log-Stufen gesunken war, war er bei gleicher Temperatur im Wasser bereits nach 40 min nicht mehr nachweisbar. Eine thermische Behandlung bei 90 °C führte bereits nach 5 min zu einer kompletten Inaktivierung im Wasser.



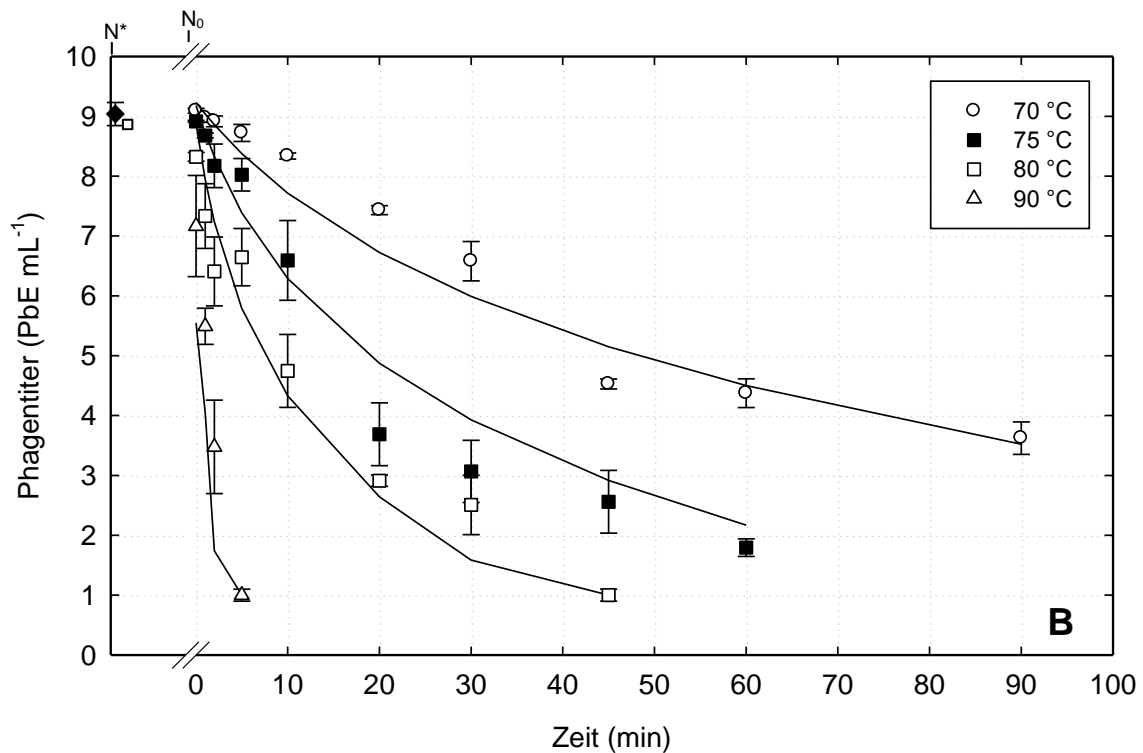


Abb. 2.6: Thermische Inaktivierung des *L. lactis* Phagen P956 in Milch (A) bei 80 °C (●), 90 °C (▽), 95 °C (■), 97.3 °C (○) und Wasser (B) bei 70 °C (○), 75 °C (◐), 80 °C (▼), 90 °C (Δ). N*: Phagentiter vor der Erhitzung (□). N₀: Anfangsphagentiter nach der Aufheizphase von 1 Minute. Nachweisgrenze der Phagen: 10¹ PbE/ml.

2.3.4 Restriktionshydrolyse der thermostabilsten Phagen

Die DNA-Restriktionsprofile der fünf thermoresistentesten Phagen (P963, P959, P956, P957 und P983) wurden mittels Eco321 und Pvull angefertigt. Damit sollte die Heterogenität der Phagen untereinander sowie zu den beiden bekannten extrem-thermoresistenten Phagen P680 und P1532 überprüft werden. Die Abbildung 2.7 zeigt, dass sich die DNA-Restriktionsmuster der neu isolierten Phagen deutlich von den Profilen der Phagen P680 und P1532 unterscheiden. Auch untereinander zeigen die meisten Phagen einen heterogenen Restriktionsverdau. Lediglich zwei Phagen (P963 und P983) zeigten nach dem Verdau mit Eco321 identische Muster.

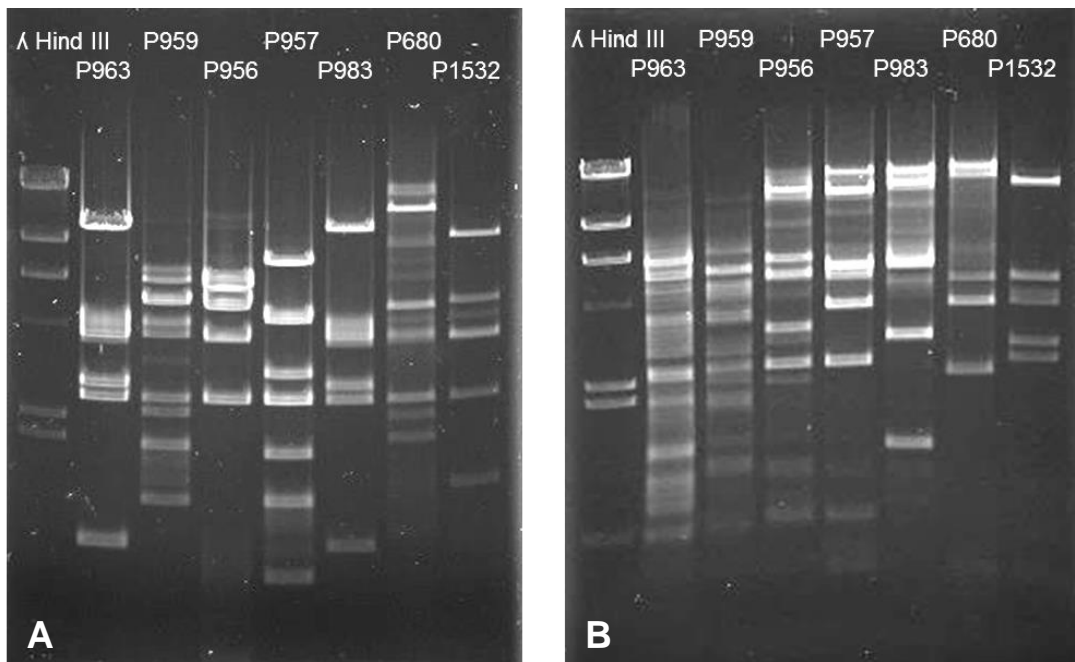


Abb. 2.7: DNA-Restriktionsverdaus der 5 Phagen aus Molkenpulver (P963, P959, P956, P957 und P983) sowie der beiden hitzeresistentesten bereits beschriebenen Vertreter der Laktokokken Phagen P680 und P1532 (Atamer et al., 2009). Die DNA wurde mit Eco321 (A) und PvuII (B) geschnitten. Als Größenreferenz wurde HindIII-geschnittene DNA des Phagen Lambda verwendet.

2.3.5 Langzeitlagerung der *L. lactis* Phagen

Die Stabilität der Phagen im trockenen Molkenpulver wurde über einen Zeitraum von vier Jahren untersucht. Die Lagerung der Molkenpulver erfolgte dabei bei 4 °C. Die Molkenpulverformulierungen wurden, wie vom Hersteller empfohlen, bei Raumtemperatur aufbewahrt. Wie in der Abbildung 2.8 zu sehen ist, hatte keine signifikante Phagentiterreduktion in den meisten Molkenpulverproben stattgefunden. Lediglich die Phagen in zwei Molkenpulverproben (MP1 und MP12) waren bereits nach einem Jahr Lagerung nicht mehr nachweisbar, jedoch hatten diese Proben einen vergleichsweise niedrigen Ausgangstiter von unter 10^2 PbE/ml. Auffällig ist, dass Phagen aus 11 Molkenpulvern, jedoch aus nur einer Molkenpulverformulierung die vierjährige Lagerung überstanden haben. Phagen in zwei Molkenpulverformulierungen (MF1 und MF5) waren bereits nach einem Jahr Lagerung nicht mehr nachweisbar, wobei hier ebenfalls sehr niedrige Anfangstiter von 10^2 PbE/ml (MF5) und 10^3 PbE/ml (MF1) vorlagen. Phagen in zwei weiteren Molkenpulverformulierungen konnten nach weiteren zwei (MF3) bzw. drei (MF2) Jahren Lagerung nicht mehr nachgewiesen werden (s. Abb. 2.8).

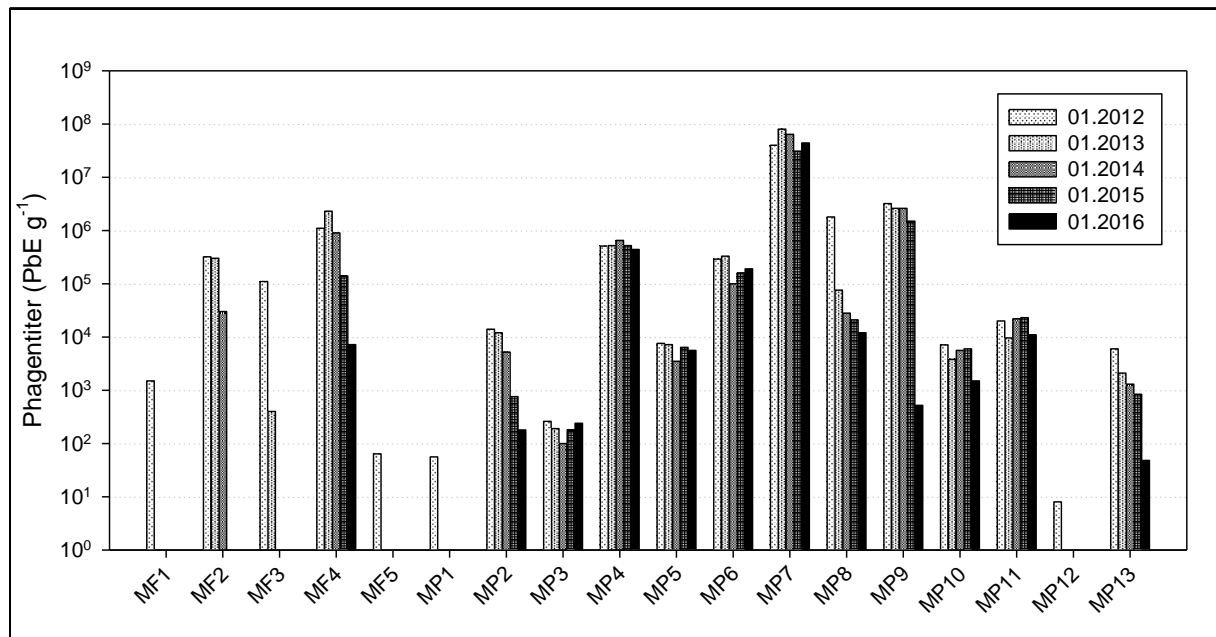


Abb. 2.8: Lagerungsstabilität der *L. lactis* Phagen aus unterschiedlichen Molkenpulverformulierungen (MF) und Molkenpulver (MP). Die Pulver wurden 48 Monate bei Raumtemperatur (MF) oder 4 °C (MP) gelagert. Der Phagentiter wurde ab dem Jahr 2012 einmal jährlich im Januar bestimmt.

2.4 Diskussion

Die Herstellung von Molkenpulver wird in den milchverarbeitenden Betrieben meist aus Molken aus verschiedenen Produktionsprozessen mit unterschiedlichen Starterkulturen hergestellt. Die Vielzahl und vor allem die biologische Vielfalt der isolierten Bakteriophagen ist somit nicht verwunderlich, da die Indikatorstämme, die zur Isolierung der Phagen eingesetzt wurden, ebenfalls ursprünglich aus verschiedenen Starterkulturen isoliert wurden. Dennoch ist die Anwesenheit von Phagen in Titern von bis zu 6×10^7 PbE/g Molkenpulver sehr kritisch für industrielle Fermentationen, in denen Molkenpulver dem Prozess zugesetzt wird. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch Phagen anderer Bakterienspezies (z. B. *Lactobacilli*) in den Molkenpulvern enthalten sein können. Atamer et al. (2009) hatten gezeigt, dass Molke aus verschiedenen Molkereien mit Phagenkonzentrationen von 10^6 - 10^9 PbE/ml Molke belastet sein kann. Da die Molke jedoch ungefähr 94 % Wasser enthält (Schuck et al., 2004), ist von einer signifikanten Phageninaktivierung während der Sprühtrocknung auszugehen. Dennoch zeigen die hohen Phagentiter in Molkenpulvern, dass diese Inaktivierung nicht ausreichend ist, um eine sichere Fermentation mit Zusatz von Molkenpulver zu gewährleisten.

In dem Thermoresistenzscreening zeigte sich die Mehrheit der *L. lactis* Phagen resistent gegenüber einer Erhitzung bei 80 °C für 5 min. Vier (P956, P963, P983, P959) der 32 Phagen haben sogar eine bemerkenswert hohe Thermoresistenz gezeigt, indem diese selbst nach einer thermischen Behandlung bei 95 °C für 5 min immer noch Plaques bilden konnten. Diese Phagen gehören zu der *L. lactis* 936 Phagengruppe, in der die meisten hitzeresistenten Phagen zu finden sind, die aus Milch oder Milchprodukten isoliert worden sind (Atamer & Hinrichs, 2010; Atamer et al., 2009). Vergleichbare Hitzeresistenz der *L. lactis* Phagen wurde bereits in der Studie von Atamer et al., (2009) beschrieben, in der vier der 56 *L. lactis* Phagen (P680, P1532, P656 und P4565), die aus unterschiedlichen Milchprodukten isoliert wurden, Temperaturen von 90 °C für 5 min überstehen konnten. Die damals isolierten *L. lactis* Phagen P680 und P1532 werden noch heute als die hitzeresistentesten Vertreter der *L. lactis* Phagen eingestuft, da sie in der Lage sind, Temperaturen von 95 bzw. 97 °C für 5 min zu überstehen (Atamer et al., 2009). Überraschenderweise konnte der in dieser Arbeit näher charakterisierte Phage P956 ebenfalls eine Erhitzung bei 97 °C überstehen – dies jedoch für 10 min. Damit ist dieser Phage hitzeresistenter einzustufen als die Phagen P680 und P1532.

Der Vergleich der Inaktivierungskinetik in den beiden Medien Wasser und Milch zeigte deutlich, dass die Inaktivierung des Phagen P956 bemerkenswert schneller im Wasser als in der Milch erfolgte. Damit übereinstimmen die Ergebnisse dieser Studie mit einer Vielzahl früherer Publikationen, die eine protektive Wirkung der Milch auf die Inaktivierung der Phagen gezeigt haben (Atamer et al., 2011; 2010; Müller-Merbach et al., 2005b; Quiberoni et al., 2003; Moroni et al., 2002; Suárez & Reinheimer, 2002).

Die Untersuchungen zur Lagerungsstabilität der Phagen im Verlauf von vier Jahren zeigten, dass keine signifikante Titerreduktion bei den meisten Phagen aus Molkenpulver stattgefunden hat. Bei den Phagen aus Molkenpulverformulierungen war dagegen lediglich eine Probe dabei, in der auch nach 4 Jahren aktive Phagen nachgewiesen werden konnten. Während die reinen Molkenpulver bei 4 °C gelagert wurden, wurden die Molkenpulverformulierungen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Allerdings ist der Unterschied zwischen den Molkenpulvern und Molkenpulverformulierungen wahrscheinlich weniger auf die Lagerungstemperatur zurückzuführen, sondern vielmehr auf die verschiedenen Zusätze in den Molkenpulverformulierungen. Dafür würde auch eine vergleichsweise hohe Stabilität der Phagen in Molkenpulverformulie-

rungen 2 und 4 sprechen. Außerdem hatte bereits Chopin (1980) berichtet, dass keine Titerreduktion bei den *L. lactis* Phagen in Milchpulver während einer 9-monatigen Lagerung bei Raumtemperatur beobachtet werden konnte. Scheinbar stellt das trockene Molkenpulver ein optimales Umgebungsmilieu für eine Vielzahl von Phagen dar, in dem diese über lange Zeiträume gelagert werden könnten. Dies ist besonders für die Molkereien, die das Molkenpulver fermentierten Produkten zusetzen, sehr problematisch. Im Bereich der Phagentherapie bringt jedoch die hohe Titerstabilität der Phagen auch viele Vorteile mit sich (Choinska-Pulit et al., 2015; Vandenheuvel et al., 2015). Zur Behandlung von Lungeninfektionen könnten z.B. Phagen im trockenen Pulver eingesetzt werden (Golshahi et al, 2010; Vandenheuvel et al, 2013, 2015). Tang et al. (2015) hatten vorgeschlagen, die Phagen im Trockenpulver zu verkapseln und durch orale Verabreichung diese dem Organismus zuzuführen.

Die Vielzahl der isolierten Phagen aus den Molkenpulvern und Molkenpulverformulierungen zeigt deutlich, dass nicht nur die „harschen“ Bedingungen während der Pulverherstellung, sondern auch die niedrige Wasseraktivität (ca. 4 %) und der hohe osmotische Druck (Jelen, 2002) keine kritische Hürde für das Überleben der Phagen darstellen.

2.5 Schlussfolgerungen

Die Annahme, dass die Phagen aus dem sprühgetrockneten Pulver eine höhere Hitzebeständigkeit aufweisen als Phagen aus flüssigen Milchprodukten, wird in dieser Arbeit bestätigt. Achtundachtzig Prozent der untersuchten *L. lactis* Phagen waren in der Lage, eine Erhitzung bei 80 °C für 5 min zu überstehen und wurden somit als thermoresistent eingestuft. Die hohe Resistenz der meisten *L. lactis* Phagen zeigt erneut, dass die üblichen in der Milchindustrie eingesetzten Pausteurisierungsbedingungen bei weitem nicht ausreichend sind, um die Mehrheit der Phagen aus dem Molkenpulver zu inaktivieren. Darüber hinaus zeigt die hohe Konzentration an Phagen, die in den Molkenpulverproben nachgewiesen wurden sowie die bemerkenswerte Langzeitstabilität der Phagen während der vierjährigen Lagerung, ein deutliches Problem der Wiederverwendung von Molkenpulver in der Milchindustrie.

Kapitel 3

Thermische Stabilität von *L. lactis* Bakteriophagen in Rohmilch bei Erhitzung in einer Pilot-Pasteurierungsanlage

Das nachfolgende Kapitel wurde bereits zur Veröffentlichung eingereicht:

Wagner, N., Matzen, S., Neve, H., Franz, C. M. A. P., Heller, K. J. & Hammer, P. (2017). Extreme thermal stability of *Lactococcus lactis* bacteriophages: evaluation of phage inactivation in a pilot-plant pasteurizer. *LWT – Food Science and Technology*, under revision.

3.1 Einleitung

Rohmilch wird als eine primäre Quelle für den Eintrag von Bakteriophagen in die Molkereien und damit in den Herstellungsprozess fermentierter Milchprodukte diskutiert (Madera et al., 2004; McIntyre et al., 1991). Sie wird meist direkt bei dem Melkprozess mit Phagen infiziert und kann von dort aus den gesamten Betrieb (Molkereien und milchverarbeitende Betriebe) verunreinigen. Um das Phagenproblem zu beseitigen, wird häufig die thermische Behandlung der Milch herangezogen. Sie gehört zu den meist erforschten Methoden der Phageninaktivierung (Atamer et al., 2010; Tamime, 2002). Dabei spielen vor allem Phagen der *L. lactis* Bakterienspezies eine wichtige Rolle. Dies liegt hauptsächlich daran, dass *L. lactis* Stämme den Hauptteil der mesophilen Starterkulturen in den meisten fermentierten Milchprodukten darstellen (Marcó et al., 2012). Demzufolge zählen Phagen dieser Bakterienspezies zu den am weitesten verbreiteten Phagen der Milchsäurebakterien.

Die thermische Inaktivierung der Bakteriophagen war in der Vergangenheit häufig Gegenstand vieler Untersuchungen (Murphy et al., 2014; Capra et al., 2013; Atamer et al., 2011; 2010; 2009; Guglielmotti et al., 2011; Marvig et al., 2011; Müller-Merbach et al., 2005a, 2005b; Madera et al., 2004; Quiberoni et al., 2003). Dabei spielten neben *L. lactis* Phagen, vor allem Phagen der *Leuconostoc*, *Lactobacillus* oder *Streptococcus* Bakterienspezies eine große Rolle - jedoch mit einer hohen Varianz in der Thermostabilität der Phagen. Die bis dato höchste Hitzeresistenz wurde bei den Phagen der *L. lactis* Phagengruppe 936 beobachtet. Atamer et al. (2009) hatten eine bemerkenswert hohe thermische Resistenz für die zwei *L. lactis* Phagen P680 und P1532 festgestellt, die aus Milchprodukten isoliert wurden. Beide waren in der Lage Temperaturen von über 90 °C für mehrere Minuten zu überstehen.

Die meisten Studien zur Hitzeinaktivierung der Bakteriophagen werden dabei unter Laborbedingungen entweder in Edelstahlröhrchen (Volumen 1,5 ml) (Capra et al., 2013; Atamer et al., 2011; 2009; Marvig et al., 2011; Müller-Merbach et al., 2005b) oder in dünnwandigen Borosilikat-Glassröhrchen (Capra et al., 2013) in einem Wasserbad durchgeführt. Ebenfalls finden sich Studien, in denen die Thermostabilität der Phagen durch die Erhitzung in einem Thermoblock getestet wurde (Murphy et al., 2014). Die Erhitzung der Phagen unter solchen Laborbedingungen spiegeln jedoch nicht die Pasteurisierungsbedingungen wieder, die in der Industrie angewendet werden. Untersuchungen zur thermischen Stabilität der Phagen unter praxisrelevanten

Bedingungen sind dagegen nur selten zu finden. Madera et al. (2004) hatten Versuche zur Phageninaktivierung in einem Plattenwärmetauscher durchgeführt und die Ergebnisse mit der Erhitzung in einem Wasserbad verglichen. Dabei konnten die Autoren eine deutlich effizientere Inaktivierung der Phagen nach der Pasteurisierung in dem Plattenwärmetauscher beobachten.

Somit war die Zielsetzung der nachfolgenden Untersuchung, die thermische Inaktivierung der *L. lactis* Phagen in Rohmilch in einer Pilot-Pasteurierungsanlage (PPA) zu untersuchen und dadurch möglichst praxisnahe bzw. praxisrelevante Bedingungen zu schaffen. *L. lactis* Phagen mit der höchsten thermischen Stabilität, P680, P1532 (936 Gruppe) und P635 (c2 Gruppe) sowie der thermosensitive Referenzphage P008 (936 Gruppe) wurden in die Untersuchung miteinbezogen. Die Untersuchung sollte Aufschluss darüber liefern, ob sich die Phageninaktivierung in der Pilot-Pasteurierungsanlage von der Inaktivierung unter den Laborbedingungen unterscheidet. Darüber hinaus sollten *D*- und *z*-Werte als kinetische Parameter der Phageninaktivierung ermittelt werden.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Bakteriophagen und Bakterienstämme

Die in der Arbeit verwendeten Bakteriophagen mit den dazugehörigen Wirtsstämmen sind in der Tabelle 3.1 dargestellt. Die TEM-Aufnahmen dieser Phagen sind der Abbildung 3.1 zu entnehmen.

Tabelle 3.1: Verwendeten Bakteriophagen und Bakterienstämme

Phage	Wirtstamm	Kopf	Schwanz	Quelle
P008	F7/2	isodiametrisch, 55 nm	160 nm	Müller-Merbach et al., 2005b
P680	F7/2	isodiametrisch, 55 nm	160 nm	Atamer et al., 2009
P1532	F7/2	isodiametrisch, 55 nm	160 nm	Atamer et al., 2009
P635	11.1Lc10	prolat, 60x45 nm	140 nm	Atamer et al., 2009

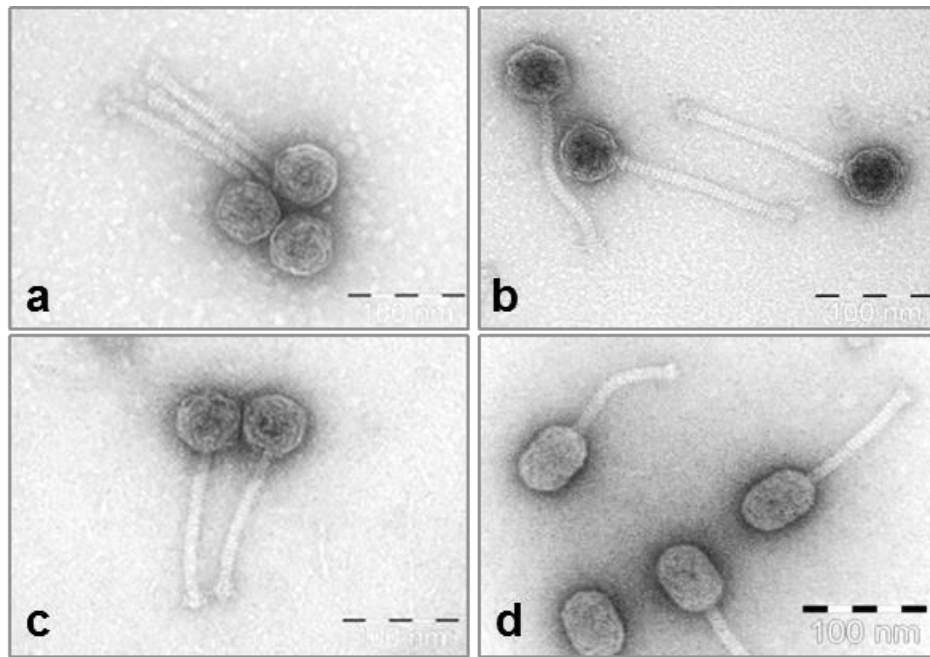


Abb. 3.1: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Phagen P008 (a), P680 (b), P1532 (c) und P635 (d).

Methoden der Anzucht der Wirtsbakterien und des Phagennachweises sind in Kap. 2 beschrieben.

3.2.2 Phagenanreicherung für den Cäsiumchlorid-Gradienten

Für die Anreicherung der Phagen über den CsCl-Gradienten wurden die Phagen wie im Abschnitt 2.2.7 beschrieben angezüchtet. Die eingesetzten Lysat- und Kulturkonzentrationen wurden dabei auf 1 Liter hochgerechnet.

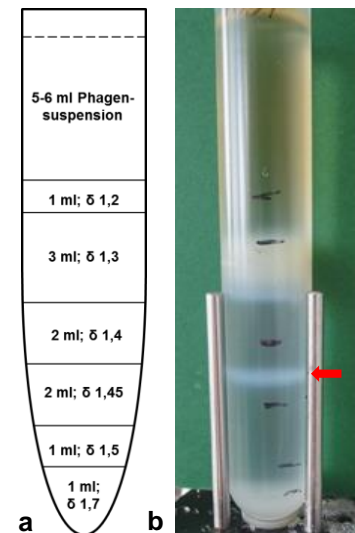
Das Phagenlysat (1 l) wurde im ersten Schritt mit je 300 µl DNase und RNase (10 mg/ml) versetzt und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Dabei wurde die freie DNA und RNA der lysierten Bakterien abgebaut. Anschließend wurde dem Lysat 1 M NaCl hinzuge-setzt und mittels eines Magnetrührers sanft gelöst. Dadurch wurden die Zelltrümmer von den Phagenpartikeln abgegrenzt und daraufhin durch Zentrifugation bei 4 °C und 7000 rpm (Beckman Coulter J2-21 Zentrifuge; Rotor: JA-10) für 10 min aus dem Phagenlysat entfernt. Der Überstand wurde 10 %ig mit PEG 6000 versetzt, sanft ge-löst und über Nacht bei 4 °C stehen gelassen. Dabei erfolgte die Fällung der Phagen, die am nächsten Tag bei 4 °C und 8000 rpm für 20 min abzentrifugiert wurden (Beckman Coulter J2-21 Zentrifuge; Rotor: JA-10). Die Phagenpellets wurden an-

schließlich in 3 ml SM-Puffer resuspendiert und auf den geschichteten CsCl-Gradienten aufgetragen.

3.2.3 Cäsiumchlorid-Gradient

Für den CsCl-Gradienten (Sambrook & Russell, 2001) wurden CsCl-Lösungen (Tabelle 3.2) in einem Zentrifugenröhrchen wie folgt aufgebaut: 1 ml CsCl-Lösung mit einer Dichte von $\delta = 1,7$; 1 ml CsCl-Lösung $\delta = 1,5$; 2 ml CsCl-Lösung $\delta = 1,45$; 2 ml CsCl-Lösung $\delta = 1,4$; 4 ml CsCl-Lösung $\delta = 1,3$; 2 ml CsCl-Lösung $\delta = 1,2$ (Abb. 3.2).

Abb. 3.2: (a) Schematische Darstellung eines aufgebauten CsCl-Gradienten und (b) Aufnahme eines zentrifugierten CsCl-Gradienten mit der Phagenbande (roter Pfeil).



Anschließend wurde der CsCl-Gradient mit 5 - 6 ml des Phagenlysats überschichtet und bei 10 °C und 25000 rpm (Optima™ L-90K; Rotor: SW32.1Ti) für 20 h zentrifugiert. Die Phagen reicherten sich dabei bei einer Dichte von 1,4 – 1,45 im Gradienten an und konnten visuell in Form einer bläulichen Bande erfasst werden. Mittels einer Kanüle und Spritze (s. Anhang, Tabelle A2) konnte die Bande anschließend abgezogen und der Phagentiter mit Hilfe eines Plaquetests (s. Kap. 2.2.6.3) bestimmt werden.

Tabelle 3.2: Lösungen und Puffer zur Herstellung des CsCl-Gradienten

CsCl-Dichte (δ)	CsCl (g)	SM-Puffer (g)		Endvolumen (ml)
1,2	8,72	ad	39	je 30
1,3	13,10		42	
1,4	17,45		45	
1,45	19,63		46,5	
1,5	21,80		48	
1,7	30,50		54	

3.2.4 Pilot-Pasteurierungsanlage

Die Pilot-Pasteurierungsanlage ist eine Anlage zur Pasteurisierung von Milch und wurde für Versuche unter praxisnahen Bedingungen konzipiert (Hammer et al., 2002; Peng et al., 2013). Die Anlage arbeitet im kontinuierlichen Durchfluss und besteht aus drei Abteilungen: Erhitzer, Heißhalter und Kühler (Abb. 3.3).

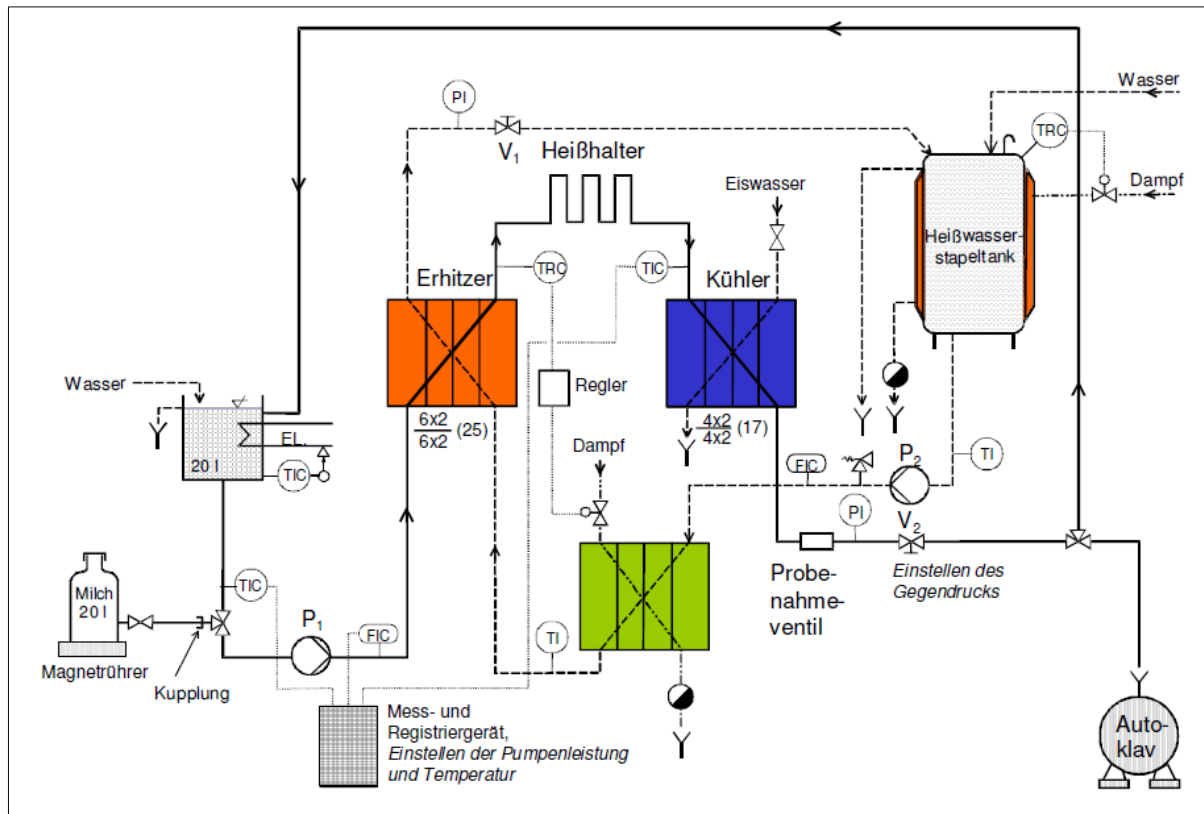


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Pilot-Pasteurierungsanlage.

Bei Eintritt der Milch in die Anlage wird zuerst der Erhitzer passiert. Dabei handelt es sich um einen Wärmeüberträger mit 25 Platten, in dem die beiden wärmeaustauschenden Flüssigkeiten in zwei parallelen Fließwegen je sechs Schläge durchlaufen müssen. Als Erhitzungsmedium wird heißes Wasser verwendet, welches durch Dampf aufgeheizt wird und sich im kontinuierlichen Kreislauf befindet.

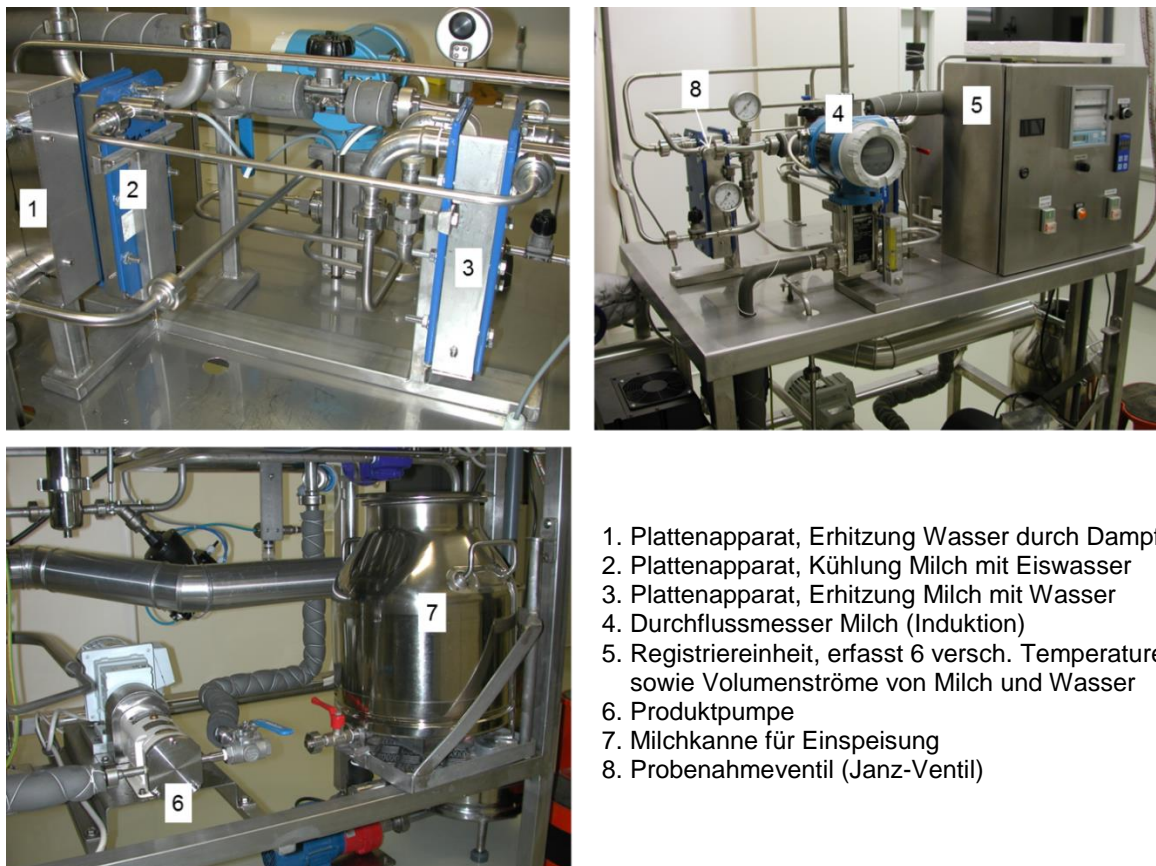
Nach Passieren des Erhitzers gelangt die Flüssigkeit zu dem Heißhalter. Der Heißhalter ist ein spiralförmiges Rohr mit einem Volumen von 140,5 ml, einem Innendurchmesser von 7 mm und einer Länge von 3,5 m. Mit dem Heißhalter können Heißhaltezeiten zwischen 10 und >40 s gefahren werden. Dies geschieht über die Einstellung des Volumenstroms, indem der Gegendruck in der Anlage, die sog. Grobeinstellung und die Pumpleistung, die sog. Feineinstellung, verändert werden. Bei den Heißhaltezeiten handelt es sich um Durchschnittswerte, da die tatsächliche

Verweilzeit eines Partikels in der Anlage immer einer Streuung unterliegt, welche bei dem hier beschriebenen Heißhalter bei ca. 13 % liegt. Um die durchschnittliche Heißhaltezeit berechnen zu können wird folgende Gleichung verwendet (Hammer et al., 2002):

$$\text{Heißhaltezeit (s)} = \frac{\text{Heißhaltervolumen (l)} \times 3600}{\text{Volumenstrom (l/h)}}$$

Nach dem Verlassen des Heißhalters gelangt die Flüssigkeit zu der zweiten Wärmeaustauschsektion, dem Kühler. Dieser besteht im Unterschied zum Erhitzer aus 17 Platten, die von den wärmeaustauschenden Flüssigkeiten in zwei parallelen Fließwegen je vier Schläge durchlaufen werden. Gekühlt wird die untersuchte Flüssigkeit mit Eiswasser.

Nach dem Verlassen des Kühlers passiert die Flüssigkeit ein Probeentnahmeventil, das sog. Janz-Ventil und gelangt anschließend zu einem Auffangbehälter, in dem die Flüssigkeit gesammelt und autoklaviert wird. In der Abbildung 3.4 sind die Bauteile der Pilot-Pasteurisierungsanlage dargestellt.



1. Plattenapparat, Erhitzung Wasser durch Dampf
2. Plattenapparat, Kühlung Milch mit Eiswasser
3. Plattenapparat, Erhitzung Milch mit Wasser
4. Durchflussmesser Milch (Induktion)
5. Registriereinheit, erfasst 6 versch. Temperaturen sowie Volumenströme von Milch und Wasser
6. Produktpumpe
7. Milchkanne für Einspeisung
8. Probenahmeventil (Janz-Ventil)

Abb. 3.4: Pilot-Pasteurisierungsanlage.

3.2.5 Versuchsaufbau

Um die Keimfreiheit der Anlage zu gewährleisten, wurde vor Beginn des Versuchs die Pilot-Pasteurierungsanlage 30 min mit 98 °C heißem Wasser betrieben. Anschließend erfolgte die Erhitzung der mit Bakteriophagen versetzten Milch. Dazu wurden 30 l gekühlte Rohmilch (Quelle: Versuchsgut Schädtebek) mit Bakteriophagen beimpft und mit Hilfe eines Magnetrührers während der gesamten Versuchszeit gerührt. Damit sollte sowohl eine gleichmäßige Verteilung der Bakteriophagen gewährleistet als auch ein Absetzen der Bakteriophagen verhindert werden. Der Ausgangs-phagentiter der Milch wurde auf ca. 10^7 PbE/ml eingestellt. In Vorversuchen wurde je nach erwarteter Thermoempfindlichkeit der Bakteriophagen die Inaktivierung bei unterschiedlichen Temperaturen bei gleichen Heißhaltezeiten ermittelt. In den Hauptversuchen wurden die einzelnen Phagen bei drei verschiedenen Temperaturen mit jeweils drei verschiedenen Heißhaltezeiten getestet. Die Probenahme erfolgte durch das Janz-Ventil mittels steriler Kunststoffspritzen (Abb. 3.4). Die Proben wurden anschließend im Eiswasser gekühlt und die Phagentiter in der Milch durch den Plaquetest (Kap. 2.2.6.3) bestimmt. Alle Versuche wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Im Anschluss an den Versuch wurde die Anlage mit heißer Lauge und Säure gereinigt.

3.2.6 Berechnung der Inaktivierungsparameter (*D*- & *z*-Werte)

Die thermischen Inaktivierungsparameter wurden ausgehend von dem linearen Modell berechnet. Dies ist das Modell, welches üblicherweise für die Hitzeinaktivierung von Mikroorganismen genutzt wird (Chick, 1908). Die quantitative Hitzeinaktivierung der Mikroorganismen wird mittels dezimaler Reduktionszeit *D* bestimmt und angegeben. Erstmals eingeführt von Katzin et al. (1943), gibt der *D*-Wert die Zeit an, in der 90 Prozent einer Population bei konstanter Temperatur absterben bzw. in der die Population auf ein Zehntel reduziert wird. Das Berechnen der *D*-Werte erfolgt über folgende Herleitung (Wittmann, 2007):

Die Hitzeinaktivierung von Mikroorganismen wird als Reaktion erster Ordnung angegeben:

$$\frac{dN}{dt} = -k \cdot N$$

N = mikrobielle Population
t = Zeit

Durch Integrieren der Parameter resultiert folgende Geradengleichung:

$$\log N_t = \log N_0 - k \cdot t$$

N_t = Keimzahl (KbE/ml) zum Zeitpunkt t
 N_0 = Keimzahl (KbE/ml) zum Zeitpunkt t_0
 k = Inaktivierungskonstante (in 1/s)
 t = Erhitzungszeit (in s)

Diese Gerade ist in der Abbildung 3.5 graphisch dargestellt.

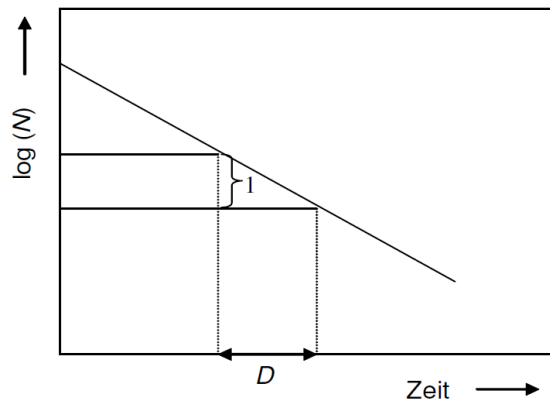


Abb. 3.5: Grafische Darstellung des D -Wertes, der aus dem Steigungsdreieck durch das Senken einer log-Keimzahl um eine Zehnerpotenz der Geraden resultiert.

Aus der Steigung der linearen Inaktivierungskurve erfolgt das Berechnen von D :

$$D = \frac{t_2 - t_1}{\log N_1 - \log N_2}$$

N_1 = Keimzahl (KbE/ml) zum Zeitpunkt t_1
 N_2 = Keimzahl (KbE/ml) zum Zeitpunkt t_2

D und k stellen die Steigung der Geraden im folgenden Zusammenhang dar:

$$D = \frac{\ln(10)}{k}$$

Die lineare Abhängigkeit der logarithmierten D -Werte von der Temperatur (Bigelow, 1921) wird durch den z -Wert charakterisiert (Stumbo, 1973). Er gibt die Temperaturerhöhung an, die notwendig ist, um den D -Wert auf ein Zehntel zu vermindern, also um den Abtötungseffekt auf das Zehnfache zu steigern (Abb. 3.6).

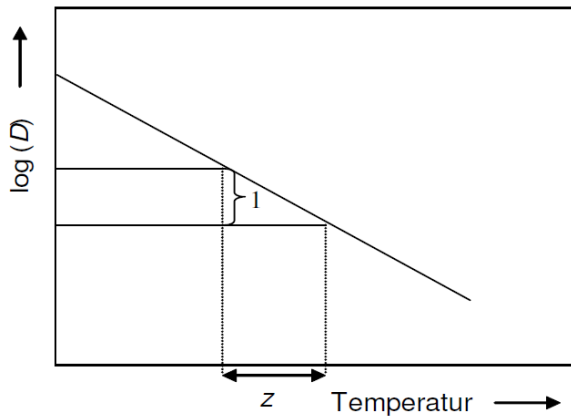


Abb. 3.6: Grafische Darstellung des z-Wertes, der aus dem Steigungsdreieck, durch das Senken des log-D-Wertes um eine Zehnerpotenz resultiert.

Der z-Wert berechnet sich entsprechend dem D -Wert aus der Geradensteigung (Wittmann, 2007):

$$z = \frac{\vartheta_2 - \vartheta_1}{\log D_1 - \log D_2}$$

D_1 = dezimale Reduktionszeit bei Temperatur ϑ_1

D_2 = dezimale Reduktionszeit bei Temperatur ϑ_2

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Kinetik der Phageninaktivierung

Zur Bestimmung der „Breakpoints“ der Phagen (Temperatur, die zu einer deutlichen Inaktivierung führt) wurden in Vorversuchen die vier Phagen bei Temperaturen zwischen 60 – 95 °C erhitzt. Die Heißhaltezeiten variierten je nach Temperatur von 25 s bei 60 bis 80 °C und 31 s bei 85 bis 95 °C. Die Temperatur wurde während der Erhitzung in 5 °C-Schritten von der höchsten zur niedrigsten eingestellt, um so eine Verschleppung der Phagen in der Pilot-Pasteurierungsanlage zu verhindern. Als Ausgangstitel wurde eine Konzentration von 10^7 PbE/ml eingestellt. In der Abb. 3.7 sind die Inaktivierungskurven der vier Phagen dargestellt. Der Phage P008 war erwartungsgemäß am hitzesensitivsten und konnte nach einer Erhitzung bei 80 °C für 25 s nicht mehr nachgewiesen werden. Ähnlich verhielt sich der hitzeresistenteste c2-Phage P635, wobei dieser erst nach einer Erhitzung bei 85 °C für 31 s komplett inaktiviert wurde. Die beiden Phagen P680 und P1532 zeigten dagegen eine deutlichere

Hitzeunempfindlichkeit und waren selbst nach einer thermischen Behandlung bei 95 °C für 31 s immer noch detektierbar, wobei der Phage P1532 die höchste Thermoresistenz aufwies (siehe Abb. 3.7).

Für die Bestimmung der Phageninaktivierungskinetik wurde die Temperatur ausgewählt, bei der die „Breakpoints“ der Phagen lagen sowie eine Temperatur über und unter dem „Breakpoint“, bei denen jedoch noch Messwerte erwartet werden konnten. Für den Phagen P008 lagen diese bei 65, 70 und 75 °C, für den Phagen P680 bei 85, 90 und 95 °C, der Phage P1532 hatte die 90, 95 und 97,5 °C und der Phage P635 die 75, 77,5 und 80 °C.

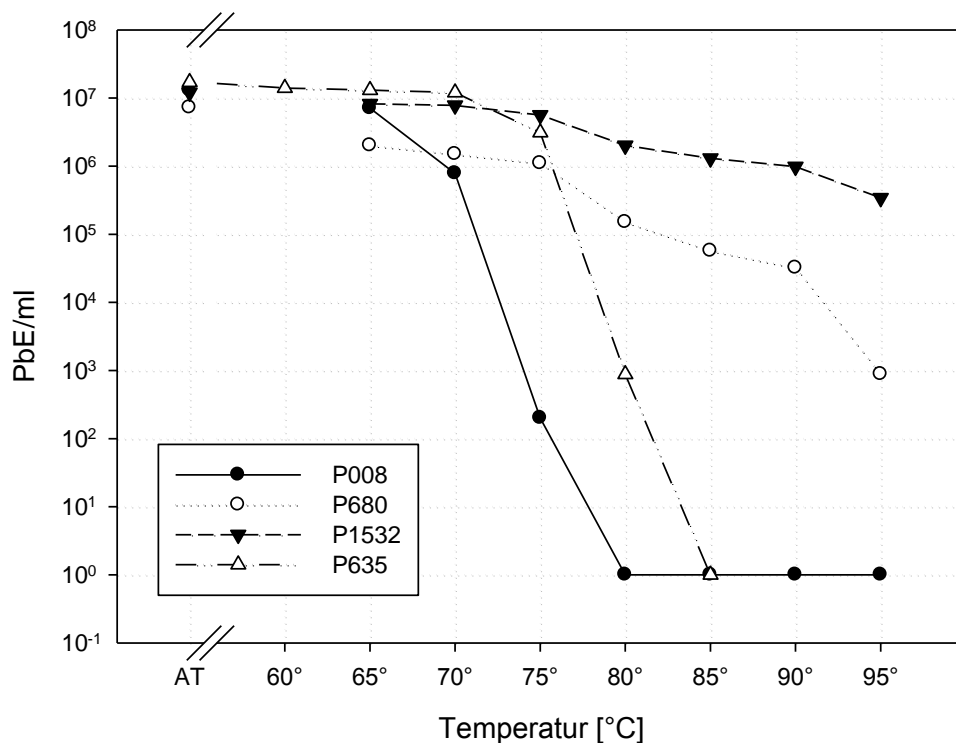


Abb. 3.7: Die Inaktivierungskurven der Phagen P008, P680, P1532 und P635 bei unterschiedlichen Temperaturen und Heißhaltezeiten von 25-31 s. AT: Ausgangstitel. Detektionsgrenze: 10⁰ PbE/ml.

Die Inaktivierungskurven aus den Hauptversuchen für die vier Phagen sind in der Abbildung 3.8 dargestellt. Für jeden Phagen wurden drei verschiedene Temperaturen aus den Vorversuchen abgeleitet und bei drei Heißhaltezeiten zwischen 16,5 und 42 s (je nach der Erhitzungstemperatur) erhitzt. Jeder Versuch wurde zweimal durchgeführt. Daraus sollten im Anschluss die *D*- und *z*-Werte der Phagen berechnet werden. Die Abb. 3.8a zeigt die Inaktivierung des Phagen P008, der nach einer Erhitzung bei 65 °C zwar relativ stabil blieb, bei 70 °C jedoch um 1,2 log-Stufen (35 s) inaktiviert wurde. Eine höhere Inaktivierung von 4,5 log-Stufen wurde bei einer Heiß-

haltezeit von 33 s und 75 °C erzielt. Der Phage P680 (Abb. 3.8b) zeigte dagegen eine deutlich höhere Hitzeresistenz. Während das Inaktivierungsverhalten des Phagen bei 85 und 90 °C nahezu identisch blieb (ca. 1,8 log-Stufen nach ca. 42 s), wurde nach einer Erhitzung bei 95 °C (40 s) eine Titerreduktion von 4,5 log-Stufen erreicht. Noch resistenter zeigte sich der Phage P1532, der nach 40 s bei 95 °C um 2 log-Stufen und bei 97,5 °C um 3,5 log-Stufen inaktiviert wurde (Abb. 3.8c). Der c2-Phage P635 konnte eine Hitzebehandlung bei 75 °C (33 s) mit einer Reduktion um 1 log-Stufe überstehen. Eine Erhitzung bei 80 °C für 32 s führte jedoch zu einer nahezu vollständigen Inaktivierung des Phagen um mehr als 6 log-Stufen (Abb. 3.8d).

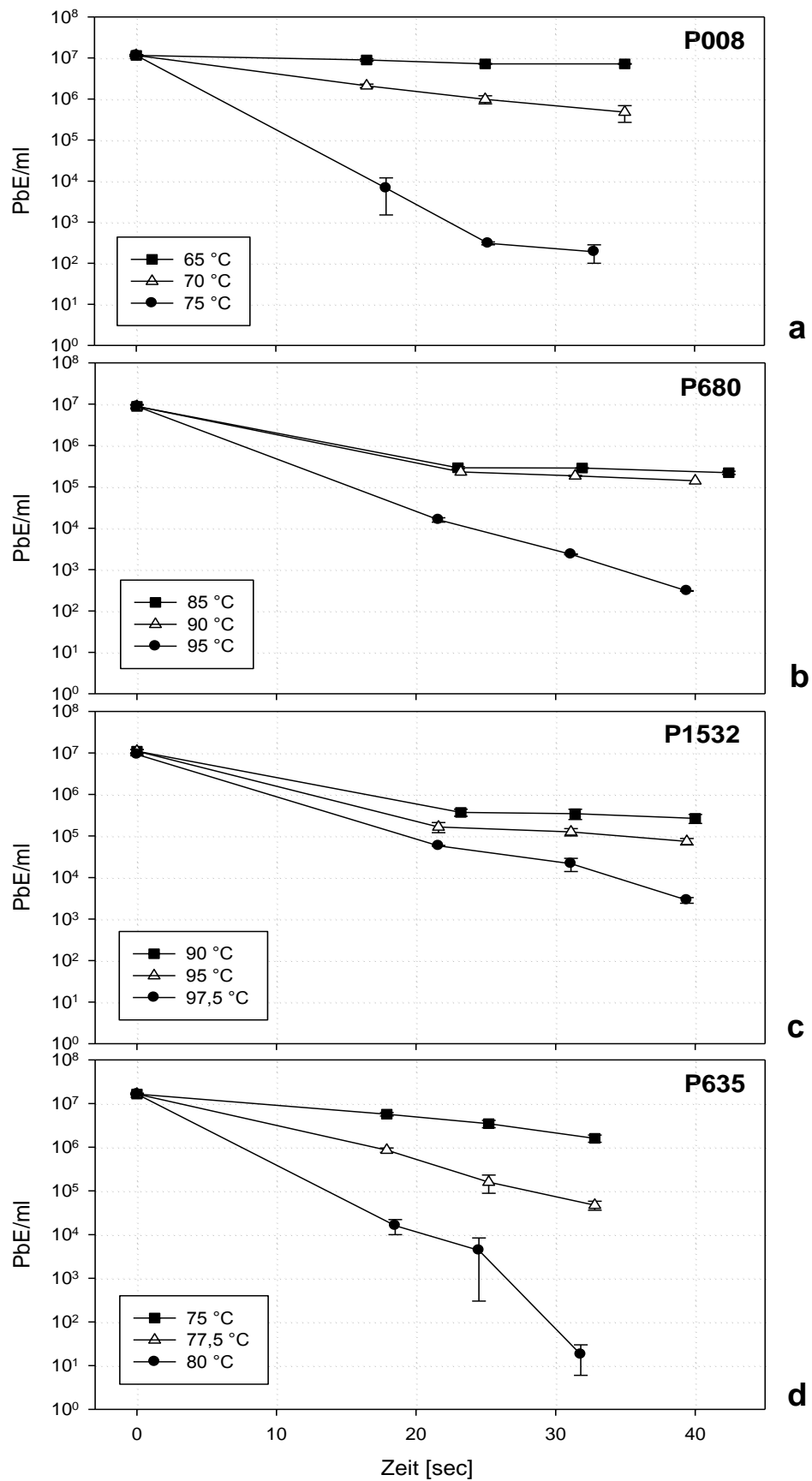


Abb. 3.8: Inaktivierungskinetik der Phagen P008 (a), P680 (b), P1532 (c) und P635 (d) bei unterschiedlichen Temperaturen und Heißhaltezeiten von 16,5 - 42 s. Die Fehlerbalken zeigen die Streuung aus zwei Versuchen an. Die Detektionsgrenze lag bei 10⁰ PbE/ml.

3.3.2 Bestimmung der Inaktivierungsparameter (*D*- & *z*-Werte)

Die Berechnung des *D*-Werts ist nachfolgend für den Phagen P008 beispielhaft dargestellt. In der Tabelle 3.3 sind die Phagentiter vor und nach der Erhitzung bei 75 °C und unterschiedlichen Heißhaltezeiten gezeigt.

Tabelle 3.3: Inaktivierungsdaten des Phagen P008 bei 75 °C und verschiedenen Heißhaltezeiten

Phagentiter (PbE/ml)	Heißhaltezeit	log-Phagentiter
$1,2 \times 10^7$	0	0
$1,5 \times 10^3$	17,9	-3,90
$2,8 \times 10^2$	25,2	-4,63
$1,0 \times 10^2$	32,2	-5,08

Um den *D*-Wert für den Phagen berechnen zu können, wurden die gemessenen Phagentiter logarithmiert und in ein Diagramm gegen die Zeit eingetragen (Abb. 3.9). Anschließend erfolgte die lineare Regression der dargestellten Werte, indem eine Gerade durch den Schwerpunkt der Werte gelegt wurde (Regressionsgerade). Dabei zeigt das sich daraus ergebende Bestimmtheitsmaß R^2 , wie viel Variation in den Daten durch die vorliegende Regression erklärt werden kann. Ein Bestimmtheitsmaß von $> 0,7$ gilt im Bereich der Hitzeinaktivierung der Mikroorganismen als akzeptabel (Martens, 2003). Bei dem Phagen P008 lag dieser bei 0,9489, somit war die lineare Regression als Anpassungsmodell in diesem Fall sehr gut. Der *D*-Wert wurde anschließend aus der Steigung der Regressionsgerade berechnet. Für den Phagen P008 lag dieser bei einer Temperatur von 75 °C bei 6,1 s.

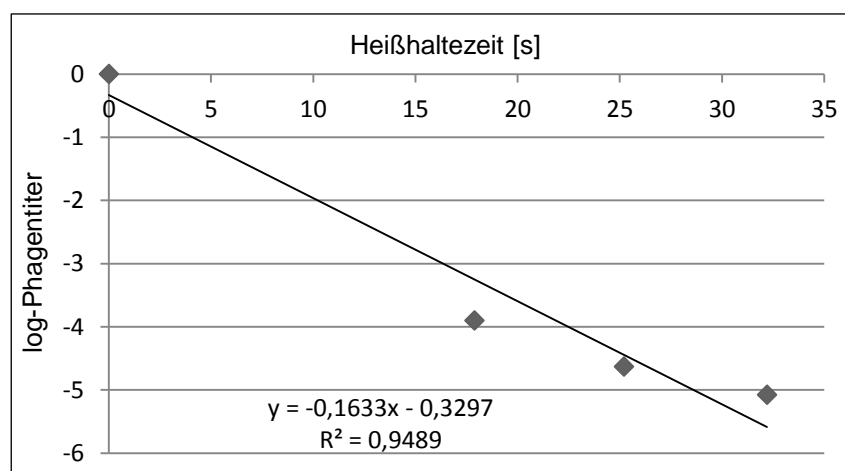


Abb. 3.9: Logarithmische Inaktivierungskurve des Phagen P008 bei 75 °C.

Die dezimalen Reduktionszeiten D sowie die dezimale Reduktionstemperatur z für alle getesteten Phagen sind der Tabelle 3.4 zu entnehmen. Die z -Werte wurden unter der Verwendung der D -Werte für die einzelnen Phagen berechnet.

Tabelle 3.4: D - und z -Werte der *L. lactis* Phagen P008, P680, P1532 und P635.

Phage	D-°C	D-Wert [s]	R ²	Mw*-D	Log Mw*-D	z-Wert
P008	75	6,1	0,95	6,5	0,81	7,2 °C
		6,8	0,96			
	70	21,1	1,00	24,8	1,39	
		28,5	0,99			
	65	137,0	0,91	162,9	2,21	
		188,7	0,90			
P680	95	8,7	0,99	8,8	0,94	21,7 °C
		8,9	1,00			
	90	20,9	0,91	21,3	1,33	
		21,7	0,91			
	85	24,5	0,86	25,5	1,41	
		26,5	0,86			
P1532	97,5	10,9	1,00	11,4	1,06	25,0 °C
		11,9	0,98			
	95	16,8	0,90	17,6	1,25	
		18,3	0,98			
	90	21,4	0,90	23,7	1,37	
		25,9	0,89			
P635	80	5,4	0,92	5,4	0,73	6,3 °C
		5,4	0,99			
	77,5	12,1	0,98	12,7	1,10	
		13,3	1,00			
	75	32,4	0,92	33,1	1,52	
		33,7	1,00			

*Mw: Mittelwert

Für den Phagen P008 wurde die größte Spannweite der D -Werte für die unterschiedlichen Temperaturen ermittelt. Während der D -Wert des Phagen für 65 °C bei 162,9 s lag, sank dieser für 70 °C auf 24,8 s und für 75 °C auf 6,5 s. Die D -Werte für die beiden hitzeresistenten Phagen P680 und P1532 zeigten ebenfalls einige Auffälligkeiten. Bei einer Erhitzungstemperatur von 90 °C lagen diese sehr nah beieinander (P680 – 21,3 s und P1532 – 23,7 s). Eine Erhöhung der Temperatur auf 95 °C resultierte jedoch in einem D -Wert von 8,8 s für den Phagen P680 und einem doppelten Wert von 17,8 s für den Phagen P1532. Die Berechnung der D -Werte für den c2-

Phagen P635 zeigte eine höhere Thermotoleranz im Vergleich zum P008 Phagen. Bei der Temperatur von 75 °C wurde für den P635 ein D -Wert von 33,1 s ermittelt, für den P008 lag dieser bei 6,5 s. Grundsätzlich lagen die Werte der Doppelbestimmung sehr nah beieinander und zeigten eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die größte Varianz wurde für den Phagen P008 bei einer Erhitzung bei 65 °C festgestellt, die jedoch durch eine insgesamt minimale Inaktivierung von ca. 0,1 log-Stufen erklärt werden kann.

Betrachtet man die aus den D -Werten ermittelten z -Werte (Tabelle 3.4), so fällt auf, dass der c2-Phage einen niedrigeren z -Wert von 6,3 °C aufweist als der Phage P008 mit einem z -Wert von 7,2 °C. Die verschiedenen z -Werte deuten darauf hin, dass bei der Extrapolation der Inaktivierungsdaten auf höhere Temperaturen (Abb. 3.10) die Hitzeeinwirkung beider Phagen allmählich konvergiert, bis - bei Temperaturen über ca. 95 °C - der Phage P635 schneller inaktiviert wird als der P008. Dies ist jedoch nur eine theoretische Betrachtung, da bei Temperaturen über 95 °C Haltezeiten von weniger als 0,01 s erforderlich sind.

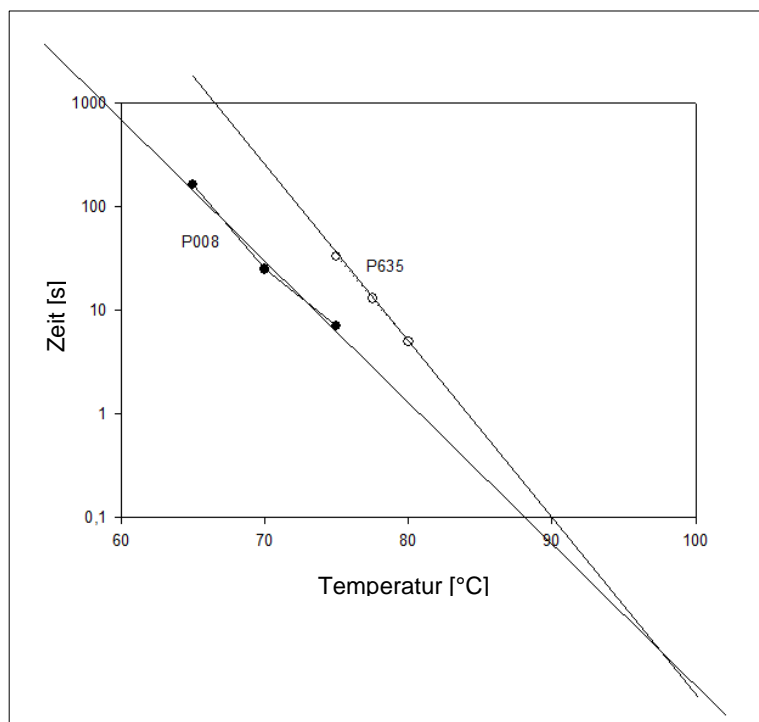


Abb. 3.10: Extrapolation der Inaktivierungsdaten der Phagen P008 und P635 auf höhere Temperaturen.

Für die beiden hitzeresistenten Phagen wurden z -Werte von 21,7 °C für P680 und 25 °C für P1532 berechnet, damit ist der Phage P1532 als der hitzeresistenteste Phage während der Erhitzung in einer Pilot-Pasteurierungsanlage einzustufen.

3.4 Diskussion

Inaktivierungsversuche in Pilot-Pasteurierungsanlagen (PPA) mit unterschiedlichen Bakterien wurden bereits zuvor in mehreren Studien beschrieben (Hammer et al., 2014, 2002; Peng et al., 2013; Lynch et al., 2007; Rademaker et al., 2007; McDonald et al., 2005; Pearce et al., 2001; Fernandez-Garayzabal et al., 1987). Es finden sich jedoch kaum Informationen zum Inaktivierungsverhalten von Bakteriophagen unter solch praxisnahen Bedingungen - wie hier dargestellt. Grundsätzlich wurde die Thermoresistenz der Bakteriophagen bereits mehrfach unter Laborbedingungen im Testmedium Milch untersucht. Dies erfolgte u.a. in Edelstahlröhrchen (Marvig et al., 2011; Atamer et al., 2009; Müller-Mehrbach et al., 2005b) und dünnwandigen Glasröhrchen (Capra et al., 2013) in einem Wasserbad oder in Eppendorf Reaktionsgefäßen in einem Thermoblock (Murphy et al., 2014). Die Unterschiede in der Thermostabilität waren dabei, abhängig vom verwendeten Gefäß, erheblich. Müller-Merbach et al. (2005b) hatten das Inaktivierungsverhalten des Phagen P008 in M17-Nährmedium und in Milch in Metallröhrchen in einem Wasserbad untersucht. Bei einer Temperatur von 75 °C wurde der Phagentiter in Milch nach 6 min Heißhaltezeit um 6 log-Stufen reduziert. Nach der Erhitzung des Phagen in der PPA wurde bereits nach 33 s eine Konzentrationsabnahme von ca. 4,5 log-Stufen gemessen. Somit erfolgt die Inaktivierung des Phagen P008 in der PPA deutlich schneller als in Edelstahlröhrchen im Wasserbad. Ähnliches wurde für den c2-Phagen P635 beobachtet. Auch hier erfolgte die Inaktivierung in einer PPA schneller als in Edelstahlröhrchen im Wasserbad (Marvig et al., 2011).

Betrachtet man die Inaktivierung der beiden thermostabilen Phagen P680 und P1532 unter Laborbedingungen (Edelstahlröhrchen im Wasserbad), so sieht man ebenfalls eine deutlich langsamere Inaktivierung der Phagen. Der Phage P680 konnte nach einer Erhitzung bei 95 °C für 5 min immer noch detektiert werden, der Phage P1532 nach 5 min bei 97 °C (Atamer et al., 2009). In der PPA waren bereits 40 s ausreichend, um die beiden Phagen um mehr als 99,99 % zu inaktivieren. Capra et al. (2013) haben zusätzlich zu den Edelstahlröhrchen die Inaktivierung der Phagen in dünnwandigen Glasröhrchen untersucht. Für beide Phagen (P680 und P1532) wurde eine langsamere Inaktivierung in Glasröhrchen im Vergleich zu den Edelstahlröhrchen dokumentiert (Capra et al., 2013).

Die berechneten *D*-Werte der Phagen unterscheiden sich folglich stark von den *D*-Werten in der Literatur. Für den Phagen P008 wird nach Erhitzung in Metallröhrchen ein *D*-Wert von 4,2 min bei einer Temperatur von 72 °C angegeben (Müller-Merbach et al., 2005b). Die Erhitzung in der PPA ergab einen *D*-Wert von ca. 25 s bei 70 °C. Ebenso verhält sich der Phage P635. Laut Marvig et al. (2011) hat der Phage nach Erhitzung in Metallröhrchen einen *D*-Wert von 2,8 min bei 75 °C, in der PPA wurde ein *D*-Wert von 33 s bei gleicher Temperatur ermittelt. Der Vergleich der *D*-Werte der beiden thermostabilen Phagen mit den Literaturangaben ist schwierig, da sich lediglich *D*-Werte für 72 °C finden lassen (P680 – 150 min, P1532 – 112 min; Atamer et al., 2009). Diese Temperatur wurde in den Untersuchungen nicht mitgetestet, man kann jedoch, aufgrund der schnelleren Inaktivierung der Phagen in der PPA, von deutlich geringeren *D*-Werten ausgehen.

Ähnliche Ergebnisse haben bereits Chopin (1980) und Madera et al. (2004) veröffentlicht, wonach die Inaktivierung der Phagen in einem Plattenwärmetauscher, welcher der industriellen Pasteurisation sehr ähnlich ist, deutlich effizienter verläuft als die Erhitzung unter Laborbedingungen. Dies könnte zum einen durch den abrupten Temperaturanstieg zu Beginn der Erhitzung in der PPA erklärt werden, verglichen mit der langsamen Aufheizphase im Röhrchen. Zum anderen wird die zu erhitzende Flüssigkeit in einem Röhrchen nach dem Einhängen in das Wasserbad nicht bewegt. Bei der Pilot-Pasteurierungsanlage handelt es sich um ein System mit kontinuierlichem Durchfluss. In dem Erhitzer und Kühler herrscht turbulente Strömung, während diese im Heißhalter an laminar und turbulent grenzt (Hammer et al., 2002; Wittmann, 2007). Das Testmedium wird im Erhitzer sehr schnell aufgeheizt, da der Volumenstrom des Wassers, mit dem die Milch erwärmt wird, mit ca. 160 l/h größer als der Produktstrom von 15 - 60 l/h ist (Wittmann, 2007). Durch die turbulente Strömung steigt auch die Wahrscheinlichkeit, dass die einzelnen Phagenpartikel mit den Wandungen des Erhitzers und des Heißhalters in Kontakt kommen, an denen die Hitze einwirkung besonders intensiv ist. Folglich erfolgt der Wärmeübergang von einem Erhitzungsmedium auf die Phagen in der Anlage schneller als bei einem ruhenden Medium im Röhrchen. Zudem kann die Verweilzeit der einzelnen Phagen im Heißhalter der PPA höher sein als angegeben, da die Partikel, bedingt durch individuelle Strömungsgeschwindigkeiten, sich nicht gleich schnell durch die Anlage bewegen (sog. Verweilzeitstreuung (Hammer et al. 2002)). Die im Versuch vorgewählte Verweilzeit wird daher üblicherweise als „mittlere Verweilzeit“ bezeichnet.

3.5 Schlussfolgerungen

Die thermische Inaktivierung der Phagen in der Pilot-Pasteurierungsanlage ist deutlich effizienter als Inaktivierungsversuche unter Laborbedingungen (Metall- oder Glasröhrchen im Wasserbad oder ein Thermoblock). Demnach kann eine konkrete Beurteilung der Hitzeinaktivierung von Phagen durch Erhitzungsverfahren nur durch Daten erfolgen, die mit praxisrelevanter Erhitzungstechnologie ermittelt wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass trotz der schnelleren Inaktivierung der Phagen in der Pilot-Pasteurierungsanlage die industrielle Erhitzung der Milch (Kurzzeiterhitzung bei 72 °C für 15 s) nicht ausreicht, um selbst hitzesensitive Phagen zu inaktivieren.

Kapitel 4

Minimierung der Phagenbelastung in Molke und Molkenprodukten durch Membranfiltration

Teile des nachfolgenden Kapitels wurden bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Samtlebe, M., Wagner, N., Neve, H., Heller, K.J., Hinrichs, J. & Atamer, Z. (2015). Application of membrane technology to remove bacteriophages from whey. *International Dairy Journal*, 48: 38-45.

Samtlebe, M., Wagner, N., Neve, H., Heller, K.J., Hinrichs, J. & Atamer, Z. (2017). Reduction of *Lactococcus lactis* phage contamination in whey by means of membrane filtration: Impact of phage morphology and of bacterial host cells functioning as "phage fishing tool. *International Dairy Journal*, 68: 88-94.

4.1 Einleitung

Ob als Frischkäse oder in harter, halbfester oder weicher Form – Käse ist seit Jahrzehnten eins der beliebtesten Milchprodukte in Deutschland. In den letzten Jahren ist der Pro-Kopf-Verbrauch an Käse stetig gestiegen und lag im Jahr 2015 bei 24,5 kg – Tendenz steigend (Milchindustrie-Verband e.V., 2016). Während der Käseherstellung werden, je nach Käsesorte, etwa 6 – 30 % der eingesetzten Milch zu Käse verarbeitet, der große Rest fällt als Molke an (Hinrichs, 2001). Früher wurde die Molke anschließend an Tiere verfüttert oder gar weggeworfen (Rektor & Vatai, 2004; Jelen, 2002), doch dank einem starken internationalen Wettbewerb, in dem sich der Käsemarkt befindet, ist die Weiterverwertung der anfallenden Molke zu einem wichtigen Produkt für viele Unternehmen geworden. Denn Molke kann sowohl zur Herstellung von unterschiedlichen nativen Molkenprodukten, wie Molkenpulver, Molkenrahm, Molkenprotein-Isolat oder -Konzentrat genutzt werden, als auch direkt im Unternehmen als Zusatz zu verschiedenen Fermentationsprodukten, zur Steigerung des Nährwertes oder zur Erhöhung der Trockenmasse, eingesetzt werden (Atamer et al., 2013; Schenkel et al., 2013; Toro-Sierra et al., 2013; Atra et al., 2005; de Wit, 1998). Vor allem bei der Käseherstellung wird Molke entweder im nativen Zustand oder in Form von Molkenprotein oder Molkenrahm dem Prozess zugesetzt (Schenkel et al., 2011; Hinrichs, 2001; Lo & Bastian, 1998; Lawrence et al., 1987; Brown & Ernstrom, 1982). Ein solches Recycling von Molkenbestandteilen birgt jedoch häufig Risiken, da die Molke mit Bakteriophagen in Konzentrationen von bis zu 10^9 PbE/ml belastet sein kann (Atamer et al., 2009; Neve et al., 1995). Zwar sollten die Hersteller eigene, native Molkenpräparate möglichst nicht im eigenen Unternehmen zur Herstellung fermentierter Milchprodukte einsetzen und damit eine Rezirkulation der Phagen möglichst vermeiden, jedoch ist nicht auszuschließen, dass auch zugekaufte Molkenprodukte Phagen enthalten können. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass Molkenpulver sehr stark mit Bakteriophagen belastet sein kann. Von den 13 untersuchten Molkenpulvern wurden alle positiv auf Phagen getestet, mit zum Teil sehr hohen Phagentitern von bis zu 6×10^7 PbE/g (Wagner et al., 2017). Fermentationsstörungen durch Bakteriophagen machen die Produktionsprozesse jedoch schlechter kalkulierbar. Selbst wenn es, aufgrund von Kulturrotationen und Verwendung von Mehrstammkulturen, nicht zu einem Totalverlust einer Charge kommt, so sind Säuerungsverzögerungen oder Qualitätsschwankungen häufig die Folge (Marcó et al., 2012).

Eine Möglichkeit, wie man die Phagen inaktivieren könnte, wäre eine thermische Behandlung der Molke. Allerdings haben Studien gezeigt, dass viele Phagen die üblichen Pasteurisierungsbedingungen (72-75 °C, 15-30 s) problemlos überstehen und in den Käseprozess gelangen können (Atamer & Hinrichs, 2010; Atamer et al., 2009; Müller-Merbach et al., 2005a, 2005b; Quiberoni et al., 2003; Suarez & Reinheimer, 2002). Zwar ist eine komplette Inaktivierung aller Bakteriophagen in der Molke durch Einsatz höherer Temperaturen möglich (Atamer & Hinrichs, 2010), jedoch würde dies auch zu einer Denaturierung der funktionellen Molkenproteine (α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin) führen (Kessler, 2002). Die Unternehmen sind jedoch bestrebt, möglichst schonende Technologien anzuwenden, um Molkenprodukte mit einem hohen Gehalt an nativen Molkenproteinen zu erhalten.

Membranfiltration wird heutzutage bereits in der Milchindustrie eingesetzt – hauptsächlich als Alternative zu technologischen Prozessen wie Zentrifugation oder Erwärmung. Dadurch sollen vor allem die funktionellen Eigenschaften von Milchprodukten verbessert werden (Rosenberg, 1995). Filtrationen mit Membrantrenngrenzen von 1,4 μm können die vorhandenen Mikroorganismen entfernen und dadurch die mikrobiologische Qualität der Produkte steigern (Schmidt et al., 2012; Pouliot, 2008; Maubois, 2002; Saboya & Maubois, 2000). Arbeiten zur Abtrennung von Bakteriophagen durch die Membranfiltration sind jedoch sehr selten. Mistry und Kosikowski (1986) haben es beispielsweise geschafft, nicht nur Milchproteine sondern auch Bakteriophagen durch Ultrafiltration (20 kDa) aus der Magermilch zu entfernen. Vermutet wird jedoch, dass die Phagenrückhaltung hauptsächlich auf die Bildung einer Foulingschicht aus Caseinmicellen und Fettkügelchen auf der Membran zurückzuführen ist (Gautier et al., 1994).

Somit war die Zielsetzung dieser Arbeit, eine nicht thermische Technologie zu entwickeln, mit der es möglich ist, den Phagentiter in Molke zu reduzieren ohne dabei Molkenproteine zu denaturieren. Die Phagenreduktion sollte mittels einer Cross-Flow-Membranfiltration für morphologisch unterschiedliche Phagen untersucht und gleichzeitig eine möglichst hohe Molkenproteinpermeation gewährleistet werden. Die Filtration sollte die Phagen in Molke soweit reduzieren, dass eine Anreicherung der Phagen in der Weiterverarbeitung minimiert werden kann.

4.2 Material und Methoden

4.2.1 Bakterienstämme und Bakteriophagen

In der Tabelle 4.1 sind die Bakteriophagen mit den dazugehörigen Wirten und ihrer morphologischen Beschreibung dargestellt.

Tabelle 4.1: Taxonomie und morphologische Beschreibung der eingesetzten *L. lactis* Phagen.

Phage	Spezies	Wirtsstamm	Kopf-form	Kopfgröße	Schwanzlänge	Referenzen
P369 <i>Podoviridae</i>	P034	F7/2	P (klein)	65x45 nm	25 nm	Braun et al., 1989 Jarvis et al., 1991
KSY1 ^(*) <i>Podoviridae</i>	KSY1	IE-16	P (groß)	260x55 nm	30 nm	Jarvis et al., 1989 Chopin et al., 2007
P001 <i>Siphoviridae</i>	c2	F7/2	P (klein)	60x40 nm	100 nm	Jarvis et al., 1991 Müller-Merbach et al., 2005a
P008 ^(*) <i>Siphoviridae</i>	936	F7/2	I (klein)	55 nm	160 nm	Mahony et al., 2006 Atamer et al., 2010
P680 ^(*) <i>Siphoviridae</i>	936	F7/2	I (klein)	55 nm	160 nm	Atamer et al., 2009 Mahony et al., 2013
P1532 <i>Siphoviridae</i>	936	F7/2	I (klein)	55 nm	160 nm	Atamer et al., 2009 Dogan & Hinrichs, 2008
TP901-1 ^(*) <i>Siphoviridae</i>	P335	3107	I (klein)	55 nm	145 nm	Brøndsted et al., 2001 Bebeacua et al., 2013
P897 <i>Siphoviridae</i>	P335	0-113-1	I (klein)	55 nm	240 nm	Neve et al., 2012
949 ^(*) <i>Siphoviridae</i>	949	ML-8	I (groß)	79 nm	530 nm	Jarvis et al., 1991 Samson & Moineau, 2010

Von den mit (*) gekennzeichneten Phagen sind die Genomsequenzen publiziert. P: prolate (langgestreckte) Köpfe, I: isodiametrische (runde) Köpfe

Methoden der Anzucht der Wirtsbakterien und des Phagennachweises sind in Kap. 2 beschrieben.

4.2.2 Aufarbeitung der Bakteriophagen über den CsCl-Gradienten

Um für die Membranversuche auf konzentriertes und aufgereinigtes Phagenmaterial zurückgreifen zu können, wurden die Phagen über den CsCl-Gradienten aufgereinigt und aufkonzentriert. Die genauere Methodenbeschreibung ist dem Kapitel 2.2.3 zu entnehmen. Die Konzentrationsbestimmung der Bakteriophagen erfolgte mittels eines Plaquetests (siehe Kap. 2.2.6.3).

4.2.3 Transmissionselektronenmikroskopie der Bakteriophagen

Die aufgereinigten Phagensuspensionen wurden transmissionselektronenmikroskopisch untersucht (siehe Kap. 2.2.8). Dadurch wurde gewährleistet, dass nur Phagen-

präparationen mit hohem Anteil an intakten Phagen (elektronenmikroskopische Schätzung: > 90-95 %) für die Membranversuche ausgewählt wurden.

4.2.4 Zur Filtration eingesetzte Molke

Die Molke wurde von dem Kooperationspartner aus dem FEI-Projekt (Universität Hohenheim) gewonnen und vorbereitet. Die Rohmilch zur Gewinnung von Molke wurde von der Lehrmolkerei Meierhof (Universität Hohenheim) zur Verfügung gestellt. Die Milch wurde zuerst entfettet (< 0,1 % Fett), pasteurisiert (74 °C für 30 s) und anschließend durch eine Keramikmembran (Membralox, type 7P19-40 GP; Pall Exekia, Bazet, Frankreich) mikrofiltriert. Die Membran wies eine Filtrationsoberfläche von 1,69 m² und einen Porendiameter von 0,1 mm auf. Die Filtration erfolgte bei einer Geschwindigkeit von 7 m/s, einer Filtrationstemperatur von 5 °C und einem Transmembrandruck von 0,1 MPa. Die Zusammensetzung der gewonnenen Molke betrug 6,29 % Trockenmasse, 0,68 % Protein, 0,01 % Fett und 5,19 % Lactose.

4.2.5 Membranen

Drei PES (Polyethersulfon)-Ultrafiltrationsmembranen (Pall Life Sciences, New York, USA) wurden für die Filtrationsversuche ausgewählt. Aufgrund der Modifizierung mit Polyethersulfon handelt es sich dabei um wenig proteinbindende Membranen. Die Trenngrenzen der Membranen lagen bei 100 kDa, 300 kDa und 500 kDa. Als Charakterisierungsmethoden für die Oberfläche der Membranen wurden von dem Kooperationspartner aus dem FEI-Projekt (Universität Hohenheim) Kontaktwinkelmessungen durchgeführt, die freie Oberflächenenergie aus den gemessenen Kontaktwinkeln ermittelt und das Wasserbindungsvermögen und die Porosität der Membranen bestimmt (nicht gezeigt).

4.2.6 Rasterelektronenmikroskopie der Membranen

Die UF-Membranen wurden elektronenmikroskopisch in einem FEI XL30 Rasterelektronenmikroskop (FEI Company, Eindhoven, Niederlande) mit Wolfram-Kathode vor und nach der Filtration untersucht. Die Membranen wurden nach der Filtration luftgetrocknet und mit Hilfe eines Skalpell in kleine Stücke geschnitten. Mittels doppelseitig-klebenden Carbonplättchen (Leit-Tabs, 12 mm Diameter, Plano GmbH,

Wetzlar, Germany) wurden die Membranstücke auf spezielle Aluminiumtischchen (Plano GmbH) angebracht (Abb. 4.1). Anschließend wurden die Proben in einem Sputter (MED 020, Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein) mit einer 20 nm Goldschicht überschichtet. Die Proben wurden in das REM eingeschleust und unter Vakuum mit einem Sekundärelektronendetektor bei einer Beschleunigungsspannung von 7,5 kV angeschaut. Die Dimensionsmessungen wurden mittels REM-Bildsoftware (Scandium; Olympus SIS; Münster, Germany) durchgeführt.



Abb. 4.1: REM-Probenteller.

4.2.7 Experimenteller Aufbau der Labormembrananlage

Eine Labormembrananlage wurde speziell für die Aufgabenstellung des Projekts an der Universität Hohenheim konzipiert, um im Labormaßstab mit Bakteriophagen gespikte Molke filtrieren zu können. Die Anlage musste mehrere Anforderungen erfüllen. Zum einen sollten in der Anlage Cross-Flow Membranfiltrationen nach dem Trennprinzip des Größenausschlusses durchführbar sein. Zum anderen sollten kleine Mengen (1-3 l) des Modellsubstrats mit Druckniveaus von 0,1 bis 0,3 MPa filtriert werden können. Schließlich sollte die Membranfiltrationszelle einfach ein- und ausbaubar sein, damit die Membranen schnell gewechselt werden können bzw. die Deckschicht nach Filtration analysiert werden kann. In der Abbildung 4.2A ist eine schematische Zeichnung der Labormembrananlage dargestellt, anhand derer die Membrananlage konzipiert und aufgebaut wurde (Abb. 4.2B).

Die Filtrationsversuche wurden im Rahmen der Kooperation innerhalb eines FEI-Projekts an der Universität Hohenheim durchgeführt.

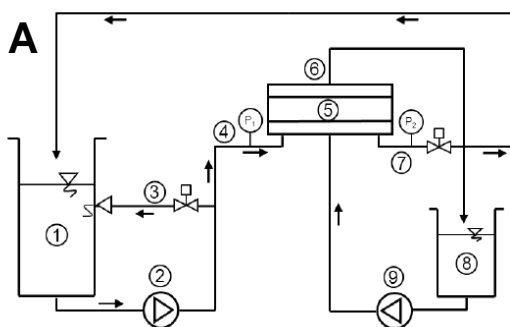


Abb. 4.2: A) Schematische Skizze der Labormembrananlage, 1: Vorlaufbehälter, 2: Pumpe, 3: Feed Bypass, 4: Retentateingang mit Manometer, 5: Membranmodul, 6: Permeatausgang, 7: Retentatausgang mit Manometer und Nadelventil, 8: Permeatbehälter, 9: Schlauchpumpe, B) Membranfiltrationsanlage mit Halteblock und Membranfiltrationszelle.

4.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese erfolgte wie im Kapitel 2.2.10 beschrieben.

4.2.9 Adsorptionsmessungen der Phagen an inaktivierte Bakterien

Der Versuchsaufbau zur Adsorptionsmessung der Phagen an thermisch inaktivierte Bakterien ist in der Abbildung 4.3 dargestellt. Die Stämme wurden sowohl unerhitzt (Kontrolle) als auch für 30, 60 und 120 min bei 63 °C erhitzt eingesetzt (Kulturen in LM17-Wachstumsmedium aus der späten log-Phase). Für die Phageninfektion wurden die Phagen P008, P369, P897 und der hitzeresistente Phage P680 ausgesucht. Nach einer 15-min Adsorptionszeit wurden die Bakterien abzentrifugiert und die Anzahl der nicht adsorbierten Phagen im Überstand bestimmt.

Die Versuche wurden mit und ohne Zusatz von Calciumchlorid (10 mM CaCl_2) durchgeführt, um den Einfluss von CaCl_2 auf die Adsorptionsfähigkeit der Phagen an die Bakterienzellen zu untersuchen.

Zusätzlich wurde die Adsorption der Phagen an mechanisch zerstörte Zellen untersucht. Der mechanische Aufschluss der Bakterien erfolgte mit Hilfe einer Zelmühle (*FastPrep FP120*, Thermo Savant). Dabei wurden Bakterienzellen mit Glasperlen (0,1 μm Durchmesser) vermischt und unter definierten Zeit-/Geschwindigkeitsparametern (5,5 m/s für 10x 30 s) zermahlen. Um einem starken Schäumen der Bakterien entgegenzuwirken, wurden diese vor dem Zermahlen zweifach mit SM-Puffer (Maniatis et al., 1989) gewaschen. Der weitere Versuchsablauf erfolgte wie oben beschrieben (Abb. 4.3).

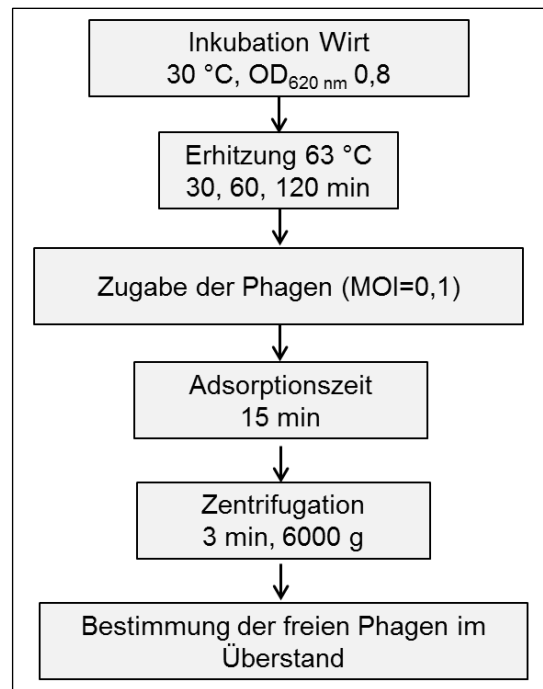


Abb. 4.3: Versuchsaufbau zur Messung der Phagenadsorption an thermisch inaktivierte Bakterien.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Elektronenmikroskopische Charakterisierung der Membranen vor der Filtration

Zur Untersuchung der Phagenretention mit den PES (Polyethersulfon)-Membranen mit unterschiedlichen Trenneigenschaften (Ausschlussgrenzen von 100, 300 und 500 kDa) wurden diese vor den Filtrationen elektronenmikroskopisch charakterisiert (Abb. 4.4 - 4.6). Die Abbildung 4.4 zeigt Aufsichtsaufnahmen der trennaktiven Oberfläche der Membranen mit unterschiedlichen Porenweiten. Für die 500 kDa-Membran wurden durchschnittliche Porengrößen von ca. 200-300 nm (Abb. 4.4A) dokumentiert, während die 300 kDa-Membran Porengrößen von ca. 70-100 nm (Abb. 4.4B) aufwies. Die Poren der 100 kDa-Membran (Abb. 4.4C) ließen sich in der Standard-REM nicht mehr auflösen. In der Abbildung 4.5 ist die charakteristische Faserstruktur der Membranunterseiten für die 300 kDa-Membran dargestellt. Der Membranquerschnitt (Abb. 4.6), mit einer Schichtdicke von ca. 210-220 nm, zeigte einen einheitlich asymmetrischen Aufbau. Unter der trennaktiven Oberseite wiesen die Membranen große Hohlräume auf, gefolgt von einer darunterliegenden Membranschicht mit kompakterer Struktur.

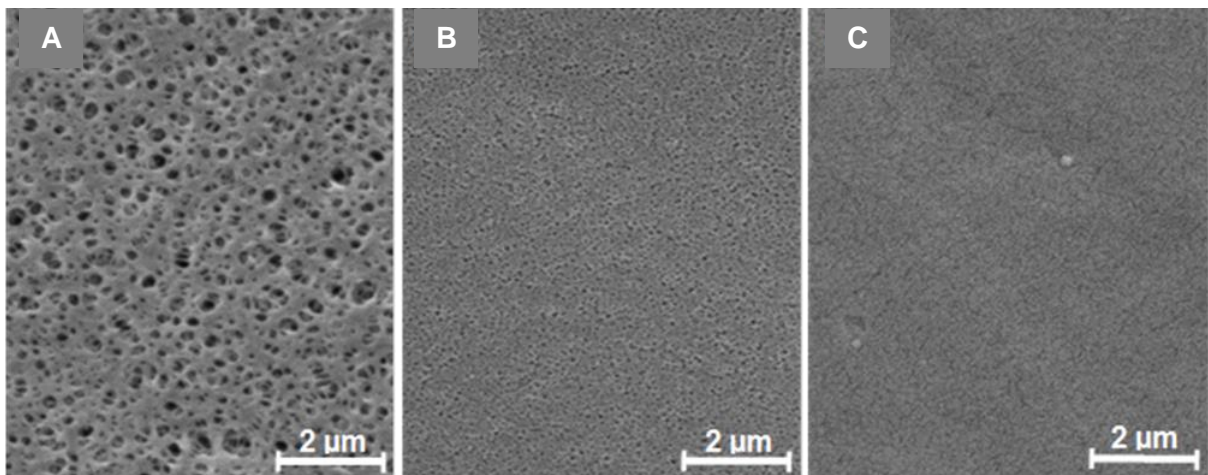


Abb. 4.4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (Aufsicht) der trennaktiven Oberflächen der unbenutzten 500 kDa- (A) 300 kDa- (B) und 100 kDa- (C) Membranen bei hoher Primärvergrößerung (7.500x). Die unterschiedlichen Porengrößen von 200-300 nm (A) bzw. 70-100 nm (B) sind erkennbar.

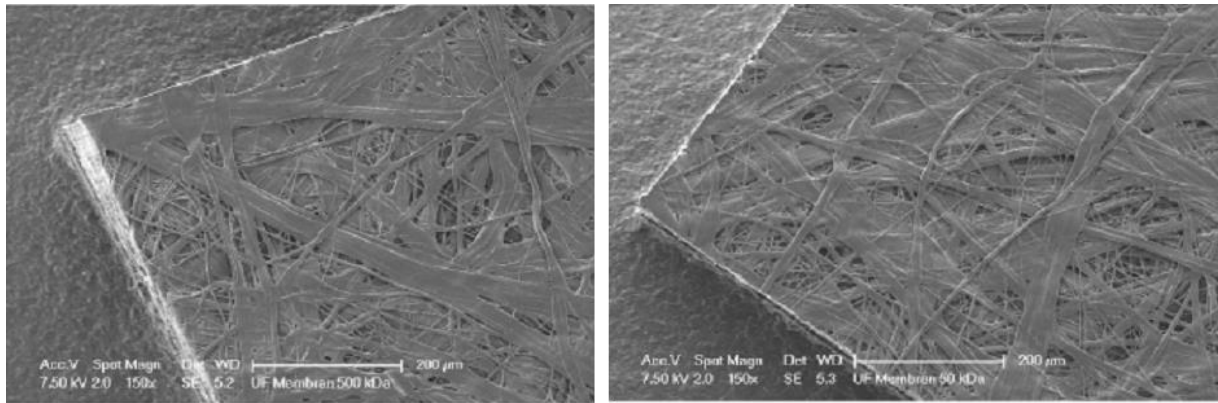


Abb. 4.5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (Aufsicht) der Trägerunterseiten der unbenutzten 500 kDa- (A) und der 100 kDa- (B) Membranen bei niedriger Primärvergrößerung (250x).

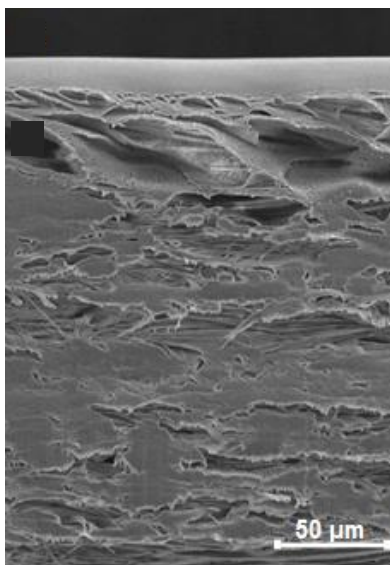


Abb. 4.6: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (Querschnitt) einer unbenutzten 300 kDa-Membran.

4.3.2 Auswahl der Modellphagen

Die Morphologie und Größe der Bakteriophagen sollten einen Einfluss auf die Phagenretention haben. Deshalb wurden für die Membranfiltrationsversuche repräsentative *L. lactis* Phagen ausgewählt (Tabelle 4.1). Die Auswahl der Phagen erfolgte nach den folgenden Kriterien:

- Morphologie der Phagen (Kopfform, Schwanzlänge)
- Lebenszyklus der Phagen (virulente und temperente Phagen)
- Phagencharakterisierung (Genomsequenzierung, sehr gute morphologische Beschreibung, Untersuchungen der thermischen Stabilität)
- Phagenverbreitung in Molkereien (weltweit verbreitete Phagengruppen 936, c2, P335 und selten vorkommende Phagengruppen P034, KSY1 und 949)

Von den ausgewählten Phagen sind transmissionselektronenmikroskopische Detailbilder bei hoher Primärvergrößerung in der Abbildung 4.7 dargestellt.

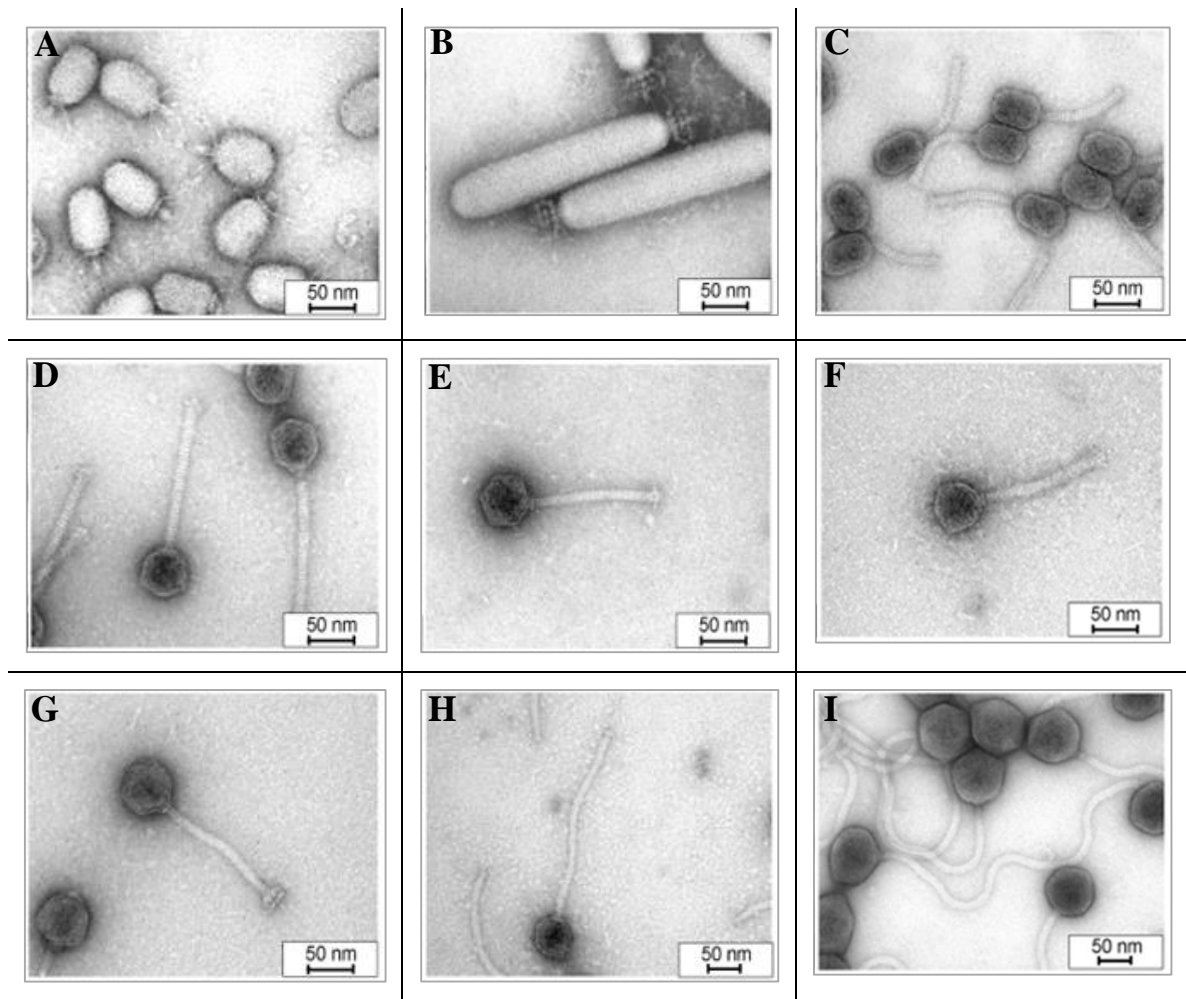


Abb. 4.7: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der aufgereinigten prolaten *L. lactis* Phagen P369 (A), KSY1 (B) und P001 (C), sowie isodiametrischen *L. lactis* Phagen P008 (D), P680 (E), P1532 (F), TP901-1 (G), P897 (H) und 949 (I) bei hoher Primärvergrößerung (210.000x (H, I bei 160.000x)).

4.3.3 Überprüfung der Lagerstabilität der Modellphagen

Die Phagenpräparate wurden im Rahmen des FEI-Projekts am Max Rubner-Institut in Kiel hergestellt und im Wesentlichen an der Universität Hohenheim eingesetzt. Für die Vergleichbarkeit der Filtrationsergebnisse sollten möglichst hochtitrige Phagenpräparationen verwendet werden.

Die Mehrheit der Phagen konnte in einer Konzentration von über 10^{12} PbE/ml hergestellt werden, sodass hochkonzentriertes und hochreines Phagenmaterial für die Filtrationsversuche zur Verfügung stand. Eine Ausnahme bildeten die beiden *Podoviridae* Phagen KSY1 und P369 und der thermostabile Phage P1532. Um die Stabilität der Phagensuspensionen während der Lagerung (4 °C) zu überprüfen und zu dokumentieren wurden Phagentiterbestimmungen über einen Zeitraum von bis zu 22 Monaten durchgeführt. Wie in der Abbildung 4.8 dargestellt ist, konnte - mit Ausnahme des Phagen P1532 - eine Reduktion der Phagentiter von bis zu vier log-Stufen festgestellt werden. Für die Phagen P001 und P897 wurde sogar eine Titerreduktion von ca. acht log-Stufen dokumentiert.

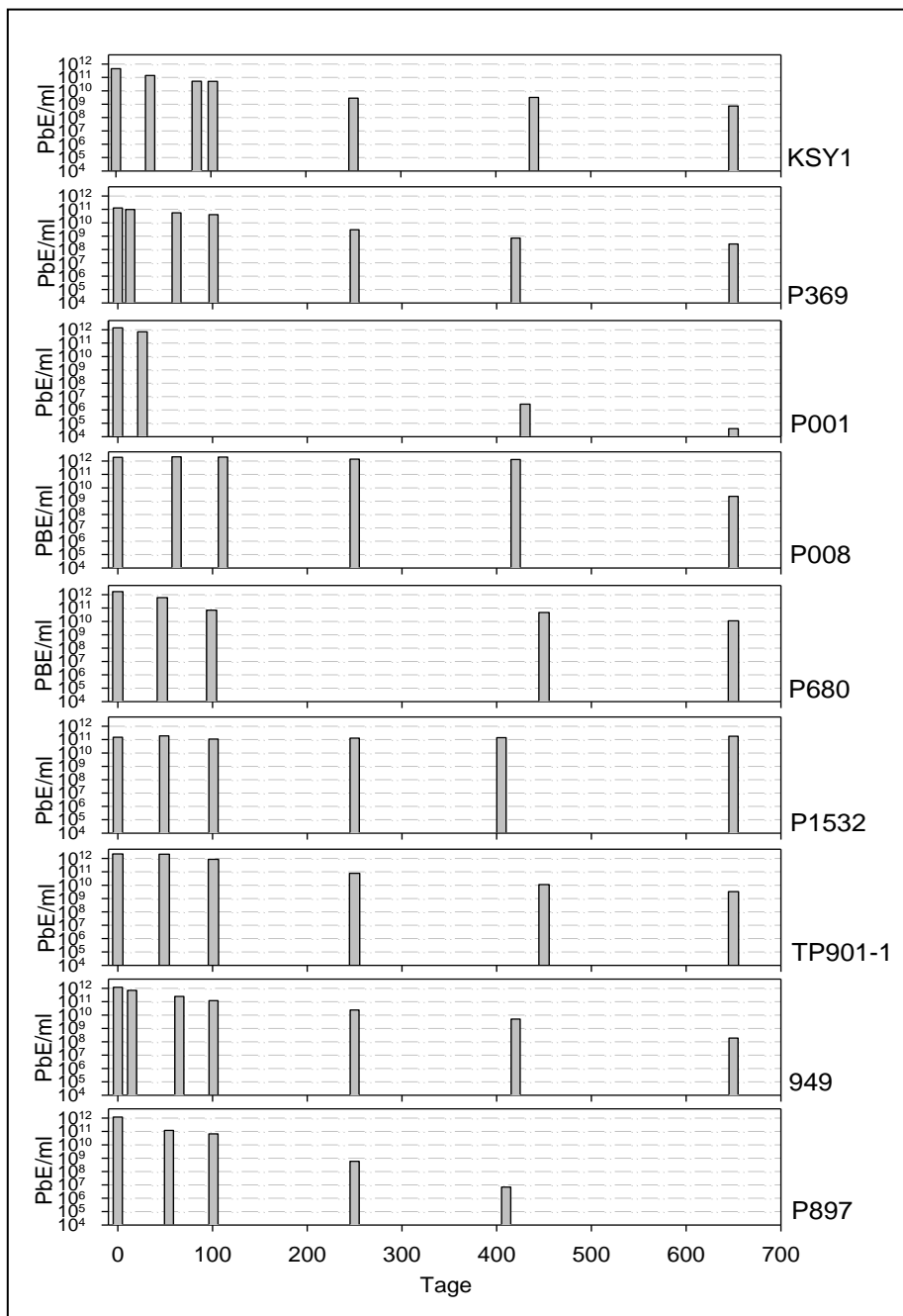


Abb. 4.8: Bestimmung der Titer (PbE/ml) der *L. lactis* Phagen nach Aufkonzentrierung und Reinigung mittels CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation und nach Lagerung bei 4 °C über ca. 22 Monate.

Zusätzlich wurden die Phagenpräparate im Verlauf der 22-monatigen Lagerung mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Diese sind in der Abbildung 4.9 exemplarisch für den Phagen P897 dargestellt. Es konnten deutliche Aggregatbildungen der Phagen (Abb. 4.9 A, B) beobachtet werden. Weiterhin wurden vermehrt defekte Phagen in Form von leeren Köpfen oder fehlenden Tails detektiert (Abb. 4.9 C, D).

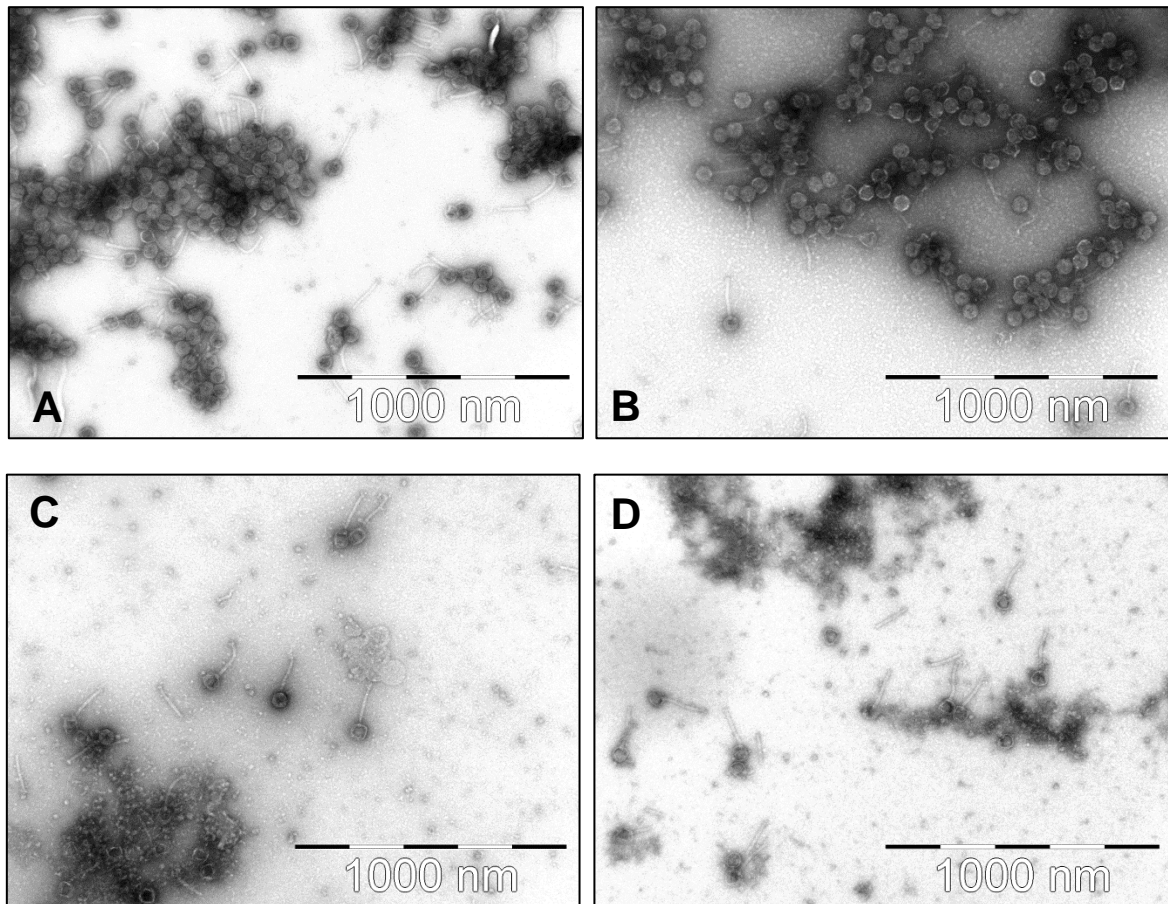


Abb. 4.9: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen des *L. lactis* Phagen P897 nach einer 22-monatigen Lagerung bei 4 °C.

4.3.4 Effekt der Membranporengröße auf die Phagenretention und Molkenproteinpermeation

Im ersten Schritt wurden der Phagenrückhalt und die Permeation an nativen Molkenproteinen in Abhängigkeit von der Membrantrenngrenze untersucht. Dies erfolgte an der Universität Hohenheim. Als Testphage wurde der Referenzphage P008 eingesetzt. In der Abbildung 4.10 ist die Reduktion der Phagentiter (Anfangstiter ca. $2,2 \times 10^7$ PbE/ml) und die Permeation der Hauptmolkenproteine α -Lactalbumin und β -

Lactoglobulin durch unterschiedliche Membranen dargestellt. Mit der steigenden Trenngrenze der Membranen nahm die Phagenretention ab. Für die 100 kDa-Membran wurde eine Reduktion von 4,4 log-Einheiten beobachtet, während für die 300 kDa-Membran eine Reduktion von 3,7 log-Einheiten und für die 500 kDa eine Reduktion von 1,3 log-Einheiten erreicht wurde. Die Permeation der Molkenproteine verhielt sich erwartungsgemäß entgegengesetzt. Durch die 100 kDa-Membran wurde eine α -LA-Permeation von ca. $59,6 \pm 0,4$ % gemessen. Filtrationsversuche mit 300 kDa- und 500 kDa-Membranen zeigten eine leichte Zunahme der α -LA-Permeation. Für die 300 kDa-Membran betrug die α -LA-Permeation $58,9 \pm 9,0$ % und 65 ± 14 % für die 500 kDa-Membran. Anders sah die Permeation von β -LG aus. Bei einer Membrantrenngrenze von 100 kDa betrug die Permeation $14,7 \pm 1,0$ % und stieg auf 57 ± 14 % bei einer 500 kDa-Membran.

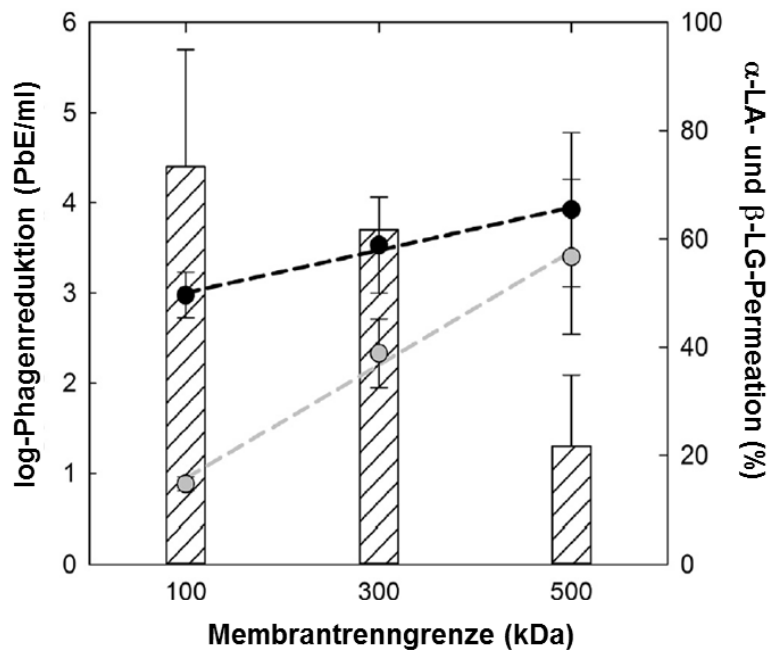


Abb. 4.10: Log-Reduktion des Phagen P008 (Balken) und Permeation des α -Lactalbumins (schwarze Linie) und β -Lactoglobulins (graue Linie) nach der Filtration mit einer 100 kDa-, 300 kDa- und 500 kDa-Membran. Der Versuch wurde in dreifach-Bestimmung durchgeführt. Die Nachweisgrenze der Phagen lag bei 10^2 PbE/ml. Die Filtration wurde bei einem Transmembrandruck von 0,2 MPa und einer Temperatur von 20 °C für insgesamt 15 min durchgeführt (Samtlebe et al., 2015).

4.3.5 Einfluss der Phagenmorphologie auf den Phagenrückhalt während der Filtration

Im zweiten Schritt wurde die Abhängigkeit der Phagenretention während der Filtration von der Phagenmorphologie untersucht. Die Abbildung 4.11 zeigt die logarithmi-

sche Reduktion der fünf *L. lactis* Phagen nach Filtration von nativer Molke mit einer 500 kDa-Membran. Die log-Reduktion für die ersten vier Phagen (P008, P001, P897 und P369), die zwar eine ähnliche Kopfgröße, jedoch deutlich unterschiedliche Schwanzlängen aufwiesen, waren nicht signifikant unterschiedlich und lagen zwischen 0,7 und 1,7 log-Einheiten. Die Filtration mit dem Phagen KSY1 zeigte dagegen deutlich höhere Titerreduktion von 2,5 log-Einheiten. Somit hatte die Größe der Phagen einen verstärkenden Effekt auf den Phagenrückhalt, war jedoch nicht spezifisch von der Schwanzlänge abhängig.

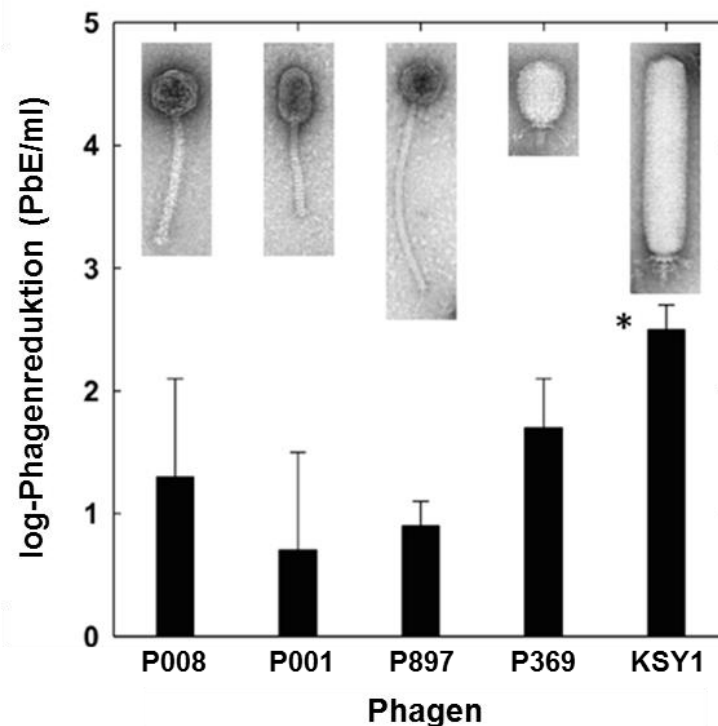


Abb. 4.11: Titerreduktion der Phagen mit unterschiedlicher Morphologie während der Filtration mit einer 500 kDa-Membran in Molke. Die Messungen erfolgten in dreifach-Bestimmung. Die Detektionsgrenze lag bei 10^1 PbE/ml. Die Filtration erfolgte bei einem Transmembrandruck von 0,2 MPa und einer Temperatur von 20 °C für 15 min. *Reduktion ist signifikant unterschiedlich ($P < 0.05$), modifiziert nach Samtlebe et al., 2017.

4.3.6 Elektronenmikroskopische Charakterisierung der Membranen nach der Filtration

Nach der Durchführung der Membranfiltrationsversuche mit idealer Molke und den Phagen P001, P008, P369 und P897 an der Universität Hohenheim (Filtration bis zu 5x durchgeführt) wurde eine 300 kDa-Membran (P369-Versuch) rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Diese Membran wurde ausgewählt, da sie den besten Kompromiss hinsichtlich maximaler Phagenretention und minimaler Molkenproteinper-

meation zeigte. Wie in der Abbildung 4.12 zu sehen, war im Membranquerschnitt eine homogene Deckschicht von ca. 2 μm auf der trennaktiven Oberseite erkennbar (Abb. 4.12B). Die Struktur der trennaktiven Seite zeigte nach dem Gebrauch deutliche, der Länge nach verlaufende Risse auf. Die sich darunter befindlichen Hohlräume waren im Vergleich zu einer unbenutzten Membran (Abb. 4.12A) viel voluminöser ausgeprägt und in Filtrationsrichtung deutlich stärker gestreckt.

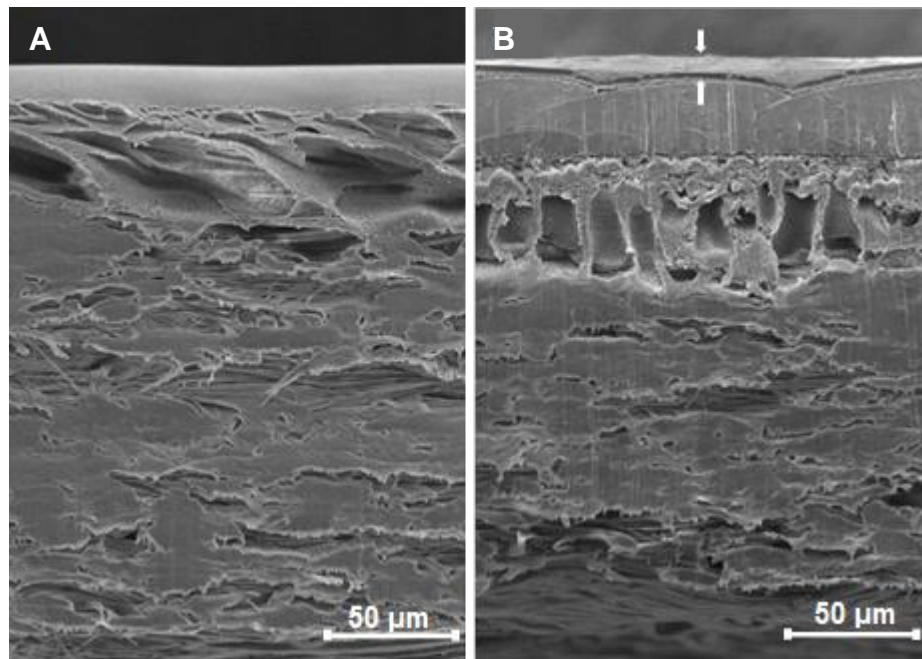


Abb. 4.12: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (Querschnitt) einer unbenutzten (A) und einer 5x gebrauchten (B) 300 kDa-Membran. In den Filtrationsversuchen wurde der Phage P369 in idealer Molke verwendet.

4.3.7 Einsatz der Bakterien als Adsorbens und Deckschichtbildner

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob der Zusatz von Bakterien zu der Molke die Phagenretention während der Filtration beeinflussen kann. Es wurden sowohl intakte als auch thermisch und mechanisch inaktivierte Bakterienzellen eingesetzt.

4.3.7.1 Adsorption der Bakteriophagen an thermisch inaktivierte Bakterien

Bevor die Bakterien als Phagen-Adsorbens in den Filtrationsversuchen eingesetzt wurden, sollte die Adsorptionsleistung der Phagen P008, P680, P369 und P897 an thermisch inaktivierte Bakterienzellen in Vorversuchen getestet werden. Die prozen-

tualen Adsorptionsraten der einzelnen Phagen sind in der Abbildung 4.13 mit (schwarz) und ohne (grau) Zusatz von CaCl_2 dargestellt.

In den Adsorptionsversuchen ohne Zugabe von CaCl_2 wurden für drei Phagen (Ausnahme P369) höhere Adsorptionsraten an unerhitzte als an erhitzte Bakterien dokumentiert. Für die Phagen P008, P680 und P897 lagen die Adsorptionsraten zwischen 63 - 81 % an unerhitzte Bakterien und zwischen 22 - 38 % an erhitzte Bakterienzellen. Die höchsten Adsorptionsraten zeigte der Phage P369 mit > 95 % sowohl an unerhitzte als auch an erhitzte Bakterien. Die Dauer der Hitzebehandlung der Wirtsbakterien hatte dabei keinen Einfluss auf die Adsorptionsleistung der Phagen.

Die Zugabe von CaCl_2 führte bei drei Phagen (P008, P369 und P897) zu einer Steigerung der Adsorption an unerhitzte und erhitzte Bakterien. Eine Ausnahme bildete der hitzeresistente Phage P680, bei dem der Zusatz von CaCl_2 keinen Einfluss auf die Adsorptionsleistung hatte.

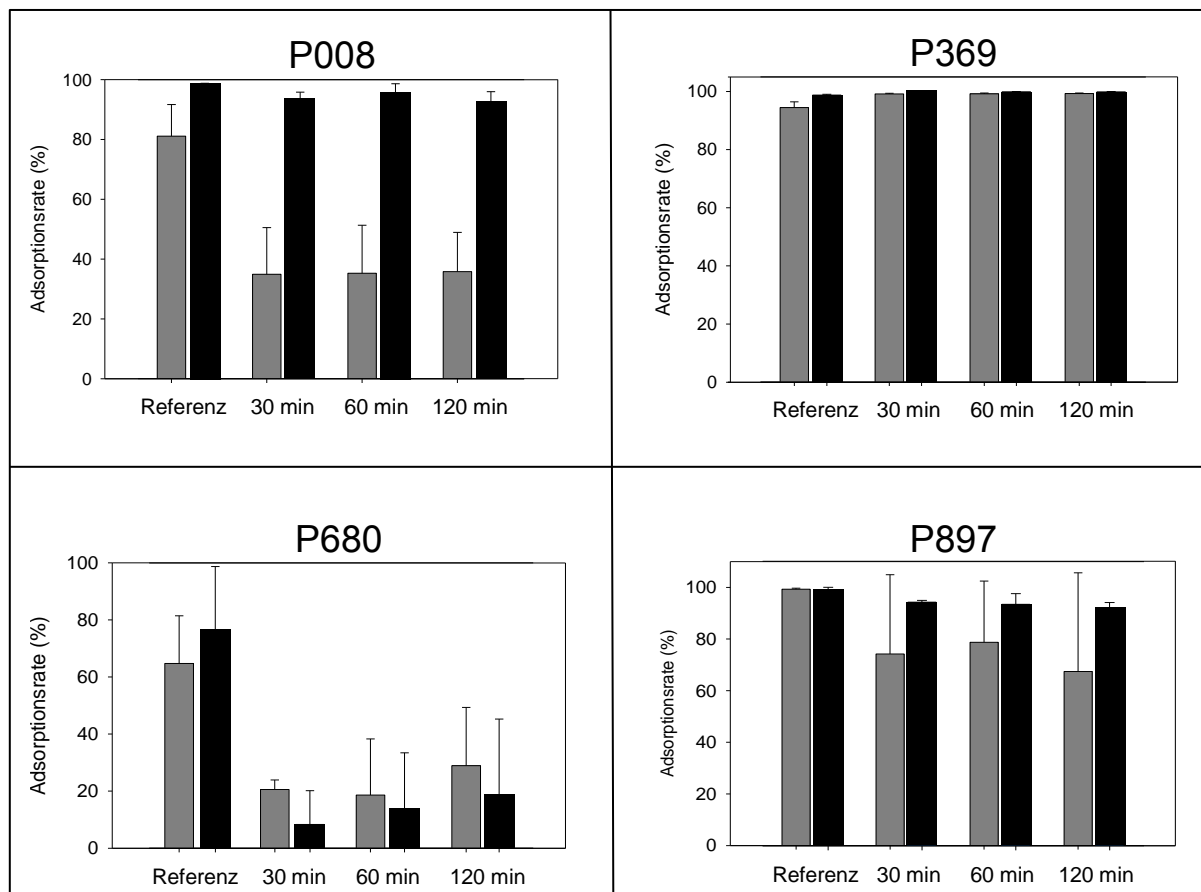


Abb. 4.13: Adsorption der Phagen P008, P369, P680 und P897 an unbehandelte (Referenz) und an für 30, 60 und 120 min bei 63 °C erhitzte Wirtszellen. Die Adsorption erfolgte ohne (grau) und mit (schwarz) Zusatz von 10 mM CaCl_2 . Alle Versuche wurden in dreifach-Bestimmung durchgeführt.

4.3.7.2 Adsorption der Bakteriophagen an mechanisch inaktivierte Bakterien

In weiteren Versuchen wurde die Phagenadsorption an mechanisch zerstörte (inaktive) Bakterien überprüft (Abb. 4.14). Die Adsorption der Phagen P008, P680 und P897 an zermahlene Bakterien war im Vergleich zu der Adsorption an erhitzte Bakterien deutlich höher (61 – 99 % an intakte und 85 – 95 % an zermahlene Bakterienzellen). Der Phage P369 zeigte erneut eine nahezu komplette Adsorption von über 99 % sowohl an intakte als auch an zermahlene Bakterienzellen (Abb. 4.13). Der Unterschied zwischen der Adsorption der Phagen mit und ohne Zugabe von CaCl_2 war bei allen vier Phagen sehr gering (max. 8 % bei der Adsorption des Phagen P008 an unbehandelte Bakterienzellen).

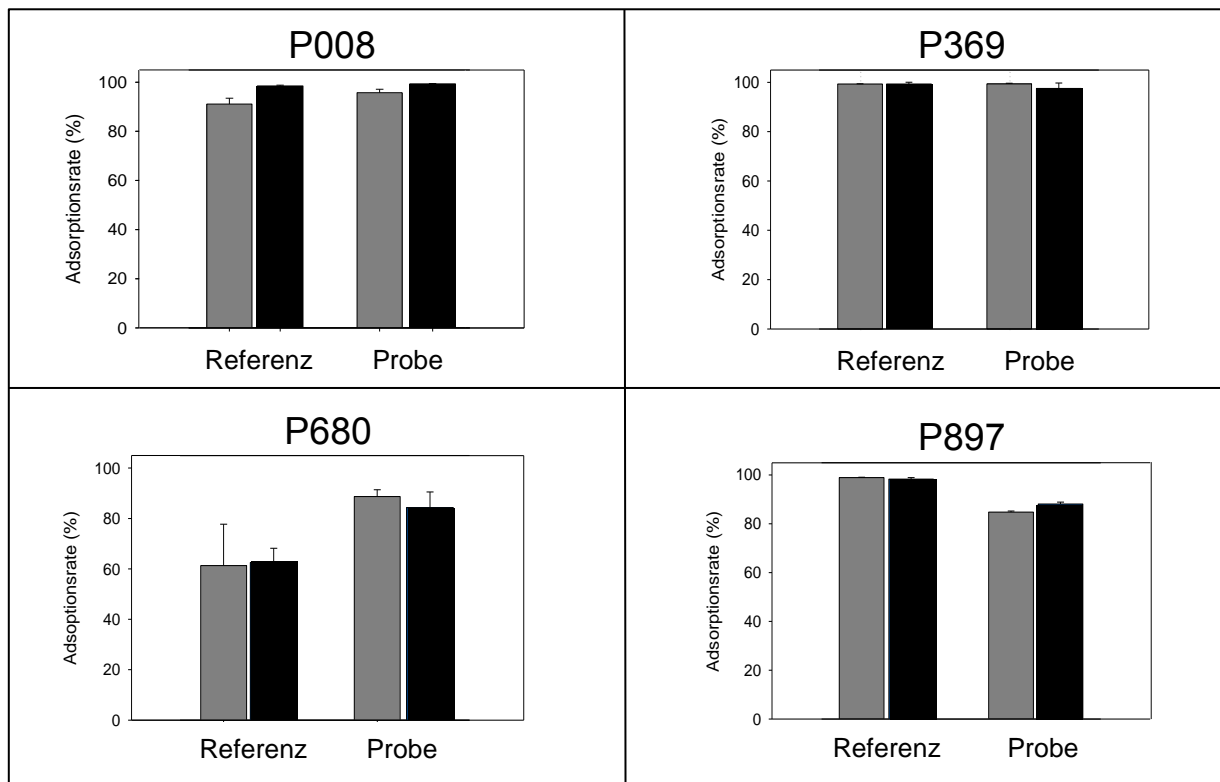


Abb. 4.14: Adsorption der Phagen P008, P369, P680 und P897 an intakte (Referenz) und zermahlene Bakterien (Probe). Die Adsorptionsversuche erfolgten ohne (grau) und mit (schwarz) Zusatz von 10 mM CaCl_2 .

4.3.7.3 Elektronenmikroskopie der Phagenadsorption an thermisch und mechanisch inaktivierte Bakterien

Die Adsorption der vier Phagen an intakte, erhitzte und mechanisch zermahlene Bakterien ist in der Abbildung 4.15 anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen dargestellt. Die erhitzten Bakterienzellen zeichneten sich stark durch die dunkle Färbung

aus, die durch eine schnelle Aufnahme des Kontrastmittels während der Zellpräparation bedingt war. Der Großteil der Bakterienzellen zeigte zudem eine signifikante Schrumpfung.

Bei den mechanisch inaktivierten Zellen hatte sich eine dichte Matrix aus "klebrigem" Zellmaterial gebildet, sodass die Phagen auf den Zelltrümmern haften konnten. Dies war vermutlich auch für die höheren Adsorptionsraten der Phagen an die zermahlenen Bakterien ausschlaggebend.

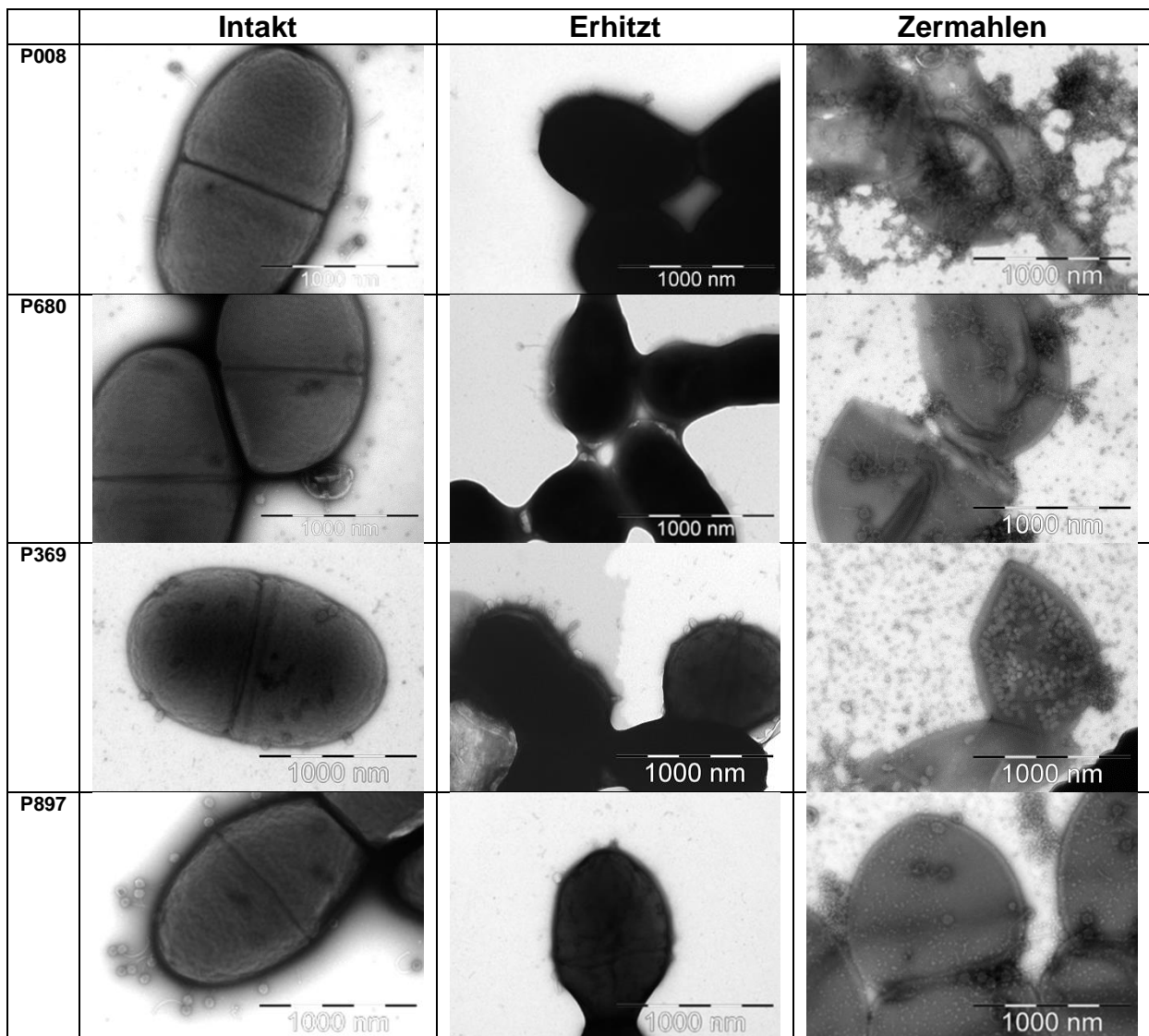


Abb. 4.15: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der Phagen P008, P680, P369 und P897 nach Adsorption an intakte, erhitzte und zermahlene Bakterienzellen.

Ausgehend von den bisherigen Ergebnissen lässt sich zusammenfassen, dass die Phagen deutlich höhere Adsorptionsraten an mechanisch als an thermisch inaktivier-

te Bakterienzellen zeigen. Nur durch die Zugabe von CaCl_2 wurde eine vergleichbare Adsorption der Phagen an thermisch inaktivierte Zellen erreicht (Ausnahme P680).

4.3.7.4 Filtration unter Einsatz der Bakterien als Adsorbens und Deckschichtbildner

Um zu überprüfen, ob die Phagenretention und die Molkenproteinpermeation durch den Einsatz von Bakterien als Adsorbens und Deckschichtbildner gesteigert werden kann, wurden Filtrationen mit nativer Molke unter Zusatz verschiedener un- und behandelter Bakterien durchgeführt. In der Abbildung 4.16 sind die Ergebnisse der einzelnen Phagenfiltrationsexperimente in Abhängigkeit von der Membrantrenngrenze (300 kDa und 500 kDa) dargestellt.

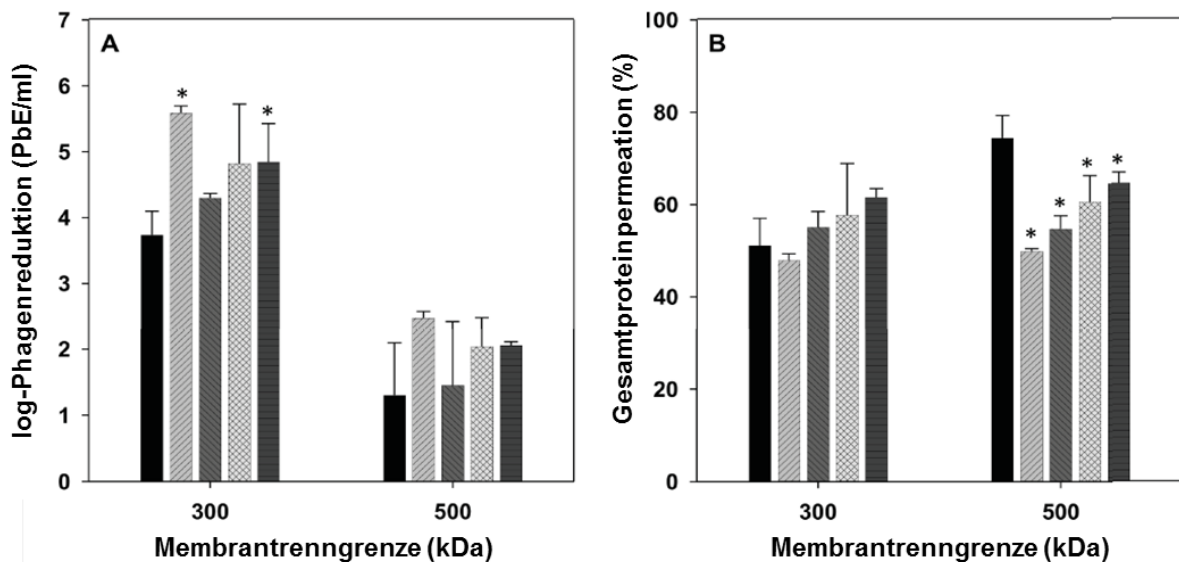


Abb. 4.16: Vergleich der P008-Phagenreduktion (A) und der Gesamtmolkenproteinpermeation (B) nach der Filtration mit einer 300 kDa- und 500 kDa-Membran: native Molke = Referenzmolke (schwarz); native Molke mit Zusatz von Bakterien, beides pasteurisiert (hellgrau gestrichelt); native Molke mit Zusatz von pasteurisierten Bakterien (grau gestrichelt); native Molke mit Zusatz von lebenden Bakterien (hellgrau gekreuzt); native Molke mit Zusatz von mechanisch inaktivierten Bakterien (dunkelgrau). Die Nachweisgrenze der Phagen lag bei 10^1 PbE/ml. Der Versuch wurde in dreifach-Bestimmung durchgeführt. Die Filtration wurde bei einem Transmembrandruck von 0,2 MPa und einer Temperatur von 20 °C für insgesamt 15 min durchgeführt. *Reduktion ist signifikant unterschiedlich zur nativen Molke ($P < 0.05$), (Samtlebe et al., 2017).

Die Filtration mit der Referenzmolke (ideale Molke, schwarz) führte zu einer Phagenretention von 3,7 (300 kDa) und 1,3 log-Einheiten (500 kDa). Die Permeation der Gesamtmolkenproteine lag bei 51 % für die 300 kDa-Membran und 74 % für die 500 kDa-Membran. In dem zweiten Ansatz (hellgrau gestrichelt), in dem die Bakterienzellen

len zusammen mit der nativen Molke pasteurisiert wurden, stieg die Phagenretention auf 5,6 (300 kDa) bzw. 2,5 log-Einheiten (500 kDa) an. Die Proteinpermeation lag bei beiden Membranen bei ca. 50 % und war vor allem bei der 500 kDa-Membran signifikant niedriger im Vergleich zu der Referenzmolke. Im dritten Ansatz (grau gestrichelt), in dem die native Molke mit pasteurisierten Bakterien gespikt wurde, lag die Phagenretention über den Werten der Referenzmolke jedoch unter der Retention des zweiten Ansatzes. Für die beiden Ansätze mit Zusatz von lebenden Bakterien (hellgrau gekreuzt) und mit Zusatz von mechanisch inaktivierten Bakterien (dunkelgrau) war die Phagenretention sehr ähnlich, jedoch wurde nur für den letzten Ansatz mit der 300 kDa-Membran eine signifikant höhere Phagenretention im Vergleich zu der Referenzmolke erreicht.

4.3.8 Bestimmung der Oberflächenladung der Phagen

Die Oberflächenladung der Phagen wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese bestimmt bzw. abgeschätzt. Phagen P008, KSY1, P369, P897 und P001, die für die Filtrationsversuche eingesetzt wurden und unterschiedliche Morphologie zeigten, wurden in die Untersuchung einbezogen. Da die Oberflächenladung für die Laufrichtung der Phagen im Agarosegel (entweder zur Anode oder zur Kathode) entscheidend sein sollte, wurden die Phagen auf ein Agarosegel aufgetragen, in dem die Proben Taschen in der Mitte platziert wurden. Dies sollte zuerst eine allgemeine Aussage über eine positive oder negative Oberflächenladung der Phagen liefern.

Für alle fünf untersuchten Phagen wurde eine negative Ladung dokumentiert. Die Stärke der negativen Ladung konnte jedoch nicht durch die Gegenüberstellung der Laufhöhe der Banden und der Phagenmorphologie (Abb. 4.17) bestimmt werden. Die beiden *Podoviridae* Phagen KSY1 und P369 (sehr kleiner Schwanz) konnten im Gel weiter wandern und mussten somit stärker negativ geladen sein als die drei geschwänzten *Siphoviridae* Phagen P008, P897 und P001. Allerdings könnten auch die längeren Schwänze der drei letzteren Phagen die Wanderungsgeschwindigkeit verringern.

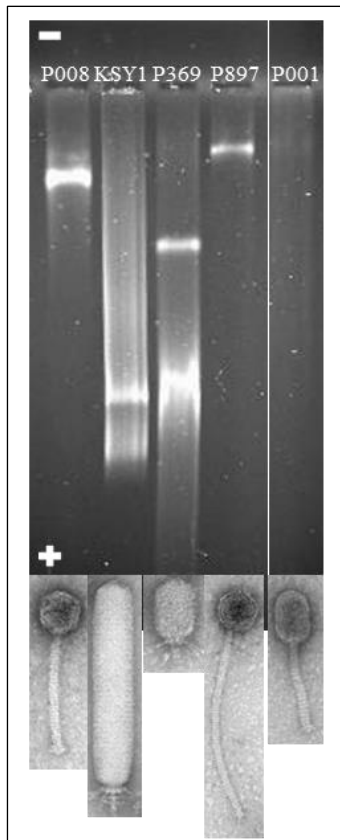


Abb. 4.17: Agarose-Gelelektrophorese (0,5 %) der Phagen P008, KSY1, P369, P897 und P001 mit den Probenröhrchen an der Anoden-seite. Alle Proben wurden mit DNase (30 min) vorbehandelt. Die Laufzeit betrug 100 min bei 100 V. Die Phagenmorphologien sind unter den Bahnen aufgeführt.

Vor dem Auftragen auf ein Agarosegel wurden die Phagen mit DNase behandelt. Dies sollte sicherstellen, dass es sich bei den mit Ethidiumbromid angefärbten Banden tatsächlich um intakte Phagen und nicht um freie DNA handelte. Zur weiteren Überprüfung wurde eine benachbarte ungefärbte Bande (in Abb. 4.18 für den Phagen P008 gezeigt) in mehrere kleine Segmente unterteilt und in jeweils 1 ml SM-Puffer (Maniatis et al., 1989) resuspendiert und die Konzentration an infektiösen Phagen bestimmt. Wie in der Abbildung 4.18 angegeben, wurde auf der Höhe der angefärbten Bande der höchste Phagentiter von 6×10^7 PbE/ml dokumentiert. Die Segmente oberhalb und unterhalb der Bande zeigten bereits deutlich niedrigere Titer von 3×10^6 bzw. 4×10^6 PbE/ml SM-Puffer und nahmen mit zunehmender Distanz zur hochtitrigen Zentralbande weiter ab. Damit wurde bestätigt, dass es sich bei der angefärbten Bande um die Hauptbande mit infektiösen Phagen handelt.

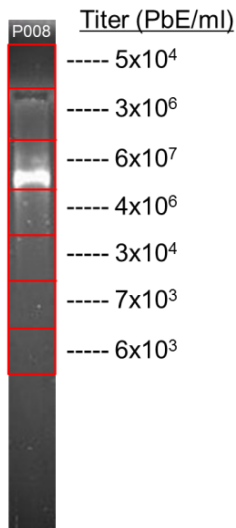


Abb. 4.18: Agarose-Gelelektrophorese (0,5 %) infektiöser P008 Phagen. Angegeben sind die Phagentiter in den einzelnen Agaroseblöcken nach Resuspendierung in je 1 ml SM-Puffer.

4.4 Diskussion

Die Filtrationsversuche mit unterschiedlichen Membrantrenngrenzen zeigten erwartungsgemäß die niedrigstete Phagenreduktion bei der Verwendung der 500 kDa-Membran. Überraschend waren jedoch die Filtrationen mit der 300 kDa- und 100 kDa-Membranen, die keinen signifikanten Unterschied in der Phagenreduktion gezeigt haben (3,7 und 4,4 log-Stufen). Die nominalen Porengrößen der Membranen liegen, laut dem Hersteller, bei 10 nm für die 100 kDa-Membran, bei 35 nm für die 300 kDa-Membran und bei 50 nm für die 500 kDa-Membran (Pall Life Sciences, USA). Damit liegt nur die 500 kDa-Membran im Bereich des Kopfdurchmessers des Phagen P008. Die Phagen können somit in hoher Anzahl die Membran passieren, was durch niedrige Phagenreduktion in dem Versuch bestätigt wurde. Die Membranporen der 100 kDa- und 300 kDa-Membran sind jedoch deutlich kleiner als die Köpfe des Phagen P008, wodurch diese während der Filtration stärker zurückgehalten werden müssten. Da die Porengrößenverteilung jedoch innerhalb der Membran variieren kann (laut dem Hersteller), konnten einige Phagenpartikel trotz des Größenunterschieds durch die Membran permeieren.

Überraschenderweise war die Permeation der Molkenproteine durch die Membranen für α -LA höher als für β -LG. Da beide Proteine jedoch eine ähnliche Molekülgröße (ca. 5 nm) aufweisen, wurde auch eine ähnliche Permeation durch die Membran erwartet. Ein Unterscheidungsmerkmal der beiden Molkenproteine ist deren molekulare Struktur. β -LG verfügt über eine freie Thiolgruppe, die über Disulfidbindungen mitei-

nander interagieren und somit zu einer Oberflächenschicht auf der Membran führen können (Steinhauer et al., 2014; Almécija et al., 2007; Mourouzidis-Mourouzidis & Karabelas, 2006; Kelly & Zydney, 1997). Zusätzlich könnte sich auf der Oberfläche der Membran eine Foulingschicht ausgebildet haben (Rezaei et al., 2011). Dieses Fouling konnte jedoch nur durch die Molkenproteine selbst verursacht sein, da die eingesetzte Molke frei von Fett, Starterkulturen und Caseinmicellen war (Almécija et al., 2007, Toro-Sierra et al., 2011). Mehrere Autoren haben bereits von einer höheren Molkenproteinretention berichtet, die durch Ausbildung einer Foulingschicht auf der Membranoberfläche verursacht wird (Gésan-Guiziou et al., 1999, Piry et al., 2008, Piry et al., 2012). Dafür sprechen auch die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen einer 300 kDa-Membran nach der Reinigung (Abb. 4.12B). Es war eine deutlich ausgeprägte homogene Deckschicht (ca. 2 µm) auf der Oberseite der Membran erkennbar. Da die Membranen mehrmals für die Filtrationsversuche verwendet wurden, ist eine Abnahme der Membranporosität bereits während der ersten Filtrationszyklen denkbar. Das Fouling könnte durch Abscheidung von Proteinpartikeln und Bildung von Aggregaten auf oder innerhalb der Membran entstanden sein, welche während des Reinigungsprozesses nicht entfernt werden konnten.

Die Filtrationsversuche mit morphologisch unterschiedlichen Phagen zeigten keine Abhängigkeit der Titerreduktion von der Schwanzlänge der Phagen, da kein signifikanter Unterschied zwischen den geschwänzten Phagen gemessen werden konnte. Dies steht im Gegensatz zu den Arbeiten von Bakhshayeshi et al. (2011), die von einer Rückhaltung der Phagen durch die Polyethersulfonmembranen berichtet haben. Die Titerreduktion bei besonders großen Phagenkapsiden wie dem KSY1 wurde jedoch während der Filtration verstärkt. Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde zusätzlich die generelle Oberflächenladung der *L. lactis* Phagen bestimmt. Dabei wurde für alle fünf untersuchten Phagen eine negative Ladung ermittelt. Grundsätzlich können die isoelektrischen Punkte der Phagen sehr variieren. Michen & Graule (2010) und Anany et al. (2011) haben gezeigt, dass die isoelektrischen Punkte der meisten Viren unter pH 7 liegen. Somit lässt sich vermuten, dass die unterschiedlichen Retentionen der Phagen auch auf die unterschiedlichen Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Membranen zurückzuführen sind (Holder et al., 2013; Huotari et al., 1999).

Die Adsorptionsversuche der Phagen an erhitzte Bakterien haben für zwei (P008 und P680) der vier untersuchten Phagen reduzierte Adsorptionsraten ergeben. Dies un-

terscheidet sich von den Untersuchungen von Binetti et al. (2002) und Geller et al. (2005), wonach die Adsorptionskapazität der Phagen nicht von der Intaktheit der Wirtszellen abhängt. Die Phagen P008 und P680 sind beide Phagen der *L. lactis* 936-Gruppe, die an einem spezifischen Zellwand-Polysaccharid (CWPS) an der Bakterienoberfläche adsorbieren. Durch den Zusatz von CaCl_2 ist die Adsorptionsrate des P008 von ca. 35 % auf ca. 95 % gestiegen. Dass die Anwesenheit zweiwertiger Kationen (Ca^{2+} oder Mg^{2+}) im Medium die Adsorption von Phagen an die Bakterienoberfläche zusätzlich begünstigt, wurde bereits von anderen Autoren beschrieben (Geller et al., 2005; Watanabe & Takesue, 1972). Dies konnte jedoch nicht für den hitzeresistenten Phagen P680 gezeigt werden.

Deutlich höhere Adsorptionsraten der Phagen wurden an mechanisch inaktivierte Zellen gemessen. Über 80 % Adsorption wurde für alle vier Phagen beobachtet. Für den Phagen P680 lag die Adsorption sogar über der Adsorptionsrate der Referenzprobe. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Studien überein, die von Adsorptionsraten der Phagen an Zelltrümmer von über 90 % berichteten (Binetti et al., 2002, Quiberoni & Reinheimer, 1998). Die höheren Adsorptionsraten könnten damit zusammenhängen, dass durch die mechanische Zermahlung der Bakterien der Zellinhalt und damit auch die DNA der Zellen freigesetzt werden und zur Verklebung der Phagen führen. Diese Annahme wurde auch durch elektronenmikroskopische Bilder der Phagenadsorption an mechanisch inaktivierte Zellen bestätigt (Abb. 4.15). Zudem muss eine ausreichend große Oberfläche mit den Rezeptorbindestrukturen vorliegen, damit ein Phage an der Zelloberfläche einer Bakterienzelle irreversibel binden kann (Mahony et al., 2016; Heller et al., 2011). Dies war durch die Entstehung einer Vielzahl von Zelltrümmern gegeben.

Durch die Filtrationsversuche mit unterschiedlichen Molkenansätzen sollte die Funktion der Bakterien als Adsorbens und Deckschichtbildner untersucht werden. Der zweite Ansatz (pasteurisierte Molke und Bakterien) sollte die industriellen Bedingungen widerspiegeln, wenn die Käsemolke vor der Weiterverarbeitung pasteurisiert wird. Es kommt jedoch vor, dass der Pasteurisierungsschritt weggelassen wird, da dies zur Denaturierung der Molkenproteine führen kann (vierter Ansatz – Molke mit intakten Bakterien). Ausgehend von der gestiegenen Phagenreduktion und der geringeren Molkenproteinpermeation des zweiten Ansatzes im Vergleich zu der Referenzmolke lässt sich schlussfolgern, dass die Pasteurisierung zur Aggregation der Molkenproteine führt (Steinhauer et al., 2015b; Kessler, 2002) und diese eine Ober-

flächenschicht auf der Membran ausbilden (Steinhauer et al., 2015a; Steinhauer et al., 2015b; Shirasaki et al., 2008). Die niedrigeren Phagenretentionen des dritten Ansatzes (mit pasteurisierten Bakterien) im Vergleich zu den höheren Retentionen des fünften Ansatzes (mit mechanisch inaktivierten Zellen) - vor allem mit der 300 kDa-Membran - spiegeln zudem sehr gut die Ergebnisse der Adsorptionsversuche wieder (siehe Kap. 4.3.6.2 und Kap. 4.3.6.3).

Sehr verwunderlich war die geringe Langzeitstabilität einiger Phagenaufarbeitungen, bei denen eine deutliche Reduktion der Phagentiter um mehrere log-Einheiten registriert wurde. Die Aufreinigung und Aufkonzentrierung dieser Phagen erfolgte über Cäsiumchlorid-Gradienten. Es ist die beste und effektivste Methode zur Herstellung hochtitriger Phagensuspensionen (Kleiner et al., 2015; Sambrook & Russell, 2001). Eine mögliche Ursache für den Titerabfall konnten die transmissionselektronenmikroskopischen Bilder liefern (Abb. 4.9). Demnach kam es im Verlauf der Lagerung zu deutlichen Aggregatbildungen der Phagen. Zudem wurden vermehrt defekte Phagen mit leeren Köpfen oder fehlenden Tails detektiert. Auch Taylor & Goldberg (1971) haben bereits eine Instabilität der Phagen in CsCl dokumentiert.

4.5 Schlussfolgerungen

Grundsätzlich lässt sich schlussfolgern, dass eine gute Phagenretention mit gleichzeitig guten Molkenproteinpermeation mittels eines Membranfiltrationsverfahrens möglich ist. Die Membrantrenngrenzen von 300 kDa stellte den besten Kompromiss hinsichtlich der Phagenretention (3,7 log-Einheiten) und Molkenproteinpermeation (α -LA ca. 40 % und β -LG ca. 60 %) dar. Neben der Porengröße der Membran scheint auch die Phagenmorphologie eine Rolle zu spielen, da v. a. besonders große Phagen wie der KSY1 von der Membran besser zurückgehalten werden. Die Schwanzlänge der Phagen spielt dagegen eine eher untergeordnete Rolle. Die Wirksamkeit der Phagenfiltration kann auch durch die Pasteurisation der Molke unter Zusatz von ebenfalls pasteurisierten Bakterien verbessert werden, da diese eine Foulingsschicht auf der Membran ausbilden. Allerdings stellen auch mechanisch inaktivierte Bakterienzellen in der Molke eine gute Möglichkeit dar, die Phagenretention zu verbessern und gleichzeitig eine akzeptable Proteinpermeation zu erzielen.

Kapitel 5

Einfluss einer Phageninfektion auf das Metabolom von Milchprodukten nach Fermentation mit einer *Leuconostoc*-Aromakultur

5.1 Einleitung

Leuconostoc-Aromastämme stellen zusammen mit *L. lactis*-Säuerungskulturen die komplexen undefinierten Vielstamm-Starterkulturen dar. Diese werden in einigen Ländern wie Deutschland und Dänemark noch sehr häufig für die Herstellung fermentierter Milchprodukte verwendet. Vor allem kleinere Molkereien greifen vermehrt zu diesen komplexen Vielstammkulturen, da nur damit ein großes Spektrum an unterschiedlichen Käsespezialitäten hergestellt werden kann. Dazu gehören insbesondere oberflächengereifte Käse und Edelschimmel-Käse. Dagegen werden in anderen Ländern nur definierte Einzel- oder Mehrstammkulturen verwendet, die ausschließlich aus *L. lactis* Stämmen bestehen, wie beispielsweise die Cheddar-Produktion in Irland, UK und der USA.

Leuconostoc-Stämme sind in den komplexen Starterkulturen mit 1-10 % aller Stämme in der Minderzahl vertreten (Hemme und Foucaud-Scheunemann, 2004). Den Hauptteil der Kultur bilden die *L. lactis* Stämme, die zu Beginn einer Fermentation bereits proteolytisch aktiv sind und homofermentativ Lactose zu Milchsäure abbauen. Erst wenn der pH-Wert unter 6,0 gesunken ist, setzt der Metabolismus der proteolytisch schwachen *Leuconostoc* Stämme ein. Diese vergären heterofermentativ und bilden aus Lactose neben Milchsäure vor allem CO₂, Ethanol sowie weitere Aromastoffe wie Diacetyl und Acetaldehyd. Die Aromastoffe werden hauptsächlich im Zuge der Citratverstoffwechslung in der Milch produziert (Cogan und Jordan, 1994, Pogacic et al., 2015) und können neben *Leuconostoc* auch von den *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* Stämmen gebildet werden (Hugenholtz et al., 1993).

Die Fähigkeit der *Leuconostoc*-Stämme zur Aromastoffbildung führt dazu, dass sich spezifische Bakteriophageninfektionen unmittelbar auf das Aromaprofil der fermentierten Produkte negativ auswirken. Zudem ist eine verminderte Lochbildung oder eine fehlerhafte Textur bei einigen Käsesorten die Folge. Da die für die Säuerung verantwortliche *L. lactis* Hauptkultur nicht betroffen ist, ist bei diesen Phageninfektionen nicht mit Säuerungsstörungen zu rechnen. Dies führt jedoch häufig dazu, dass die Bakteriophageninfektionen in den fermentierten Produkten nicht oder nur sehr spät (z.B. bei der Käsereifung) entdeckt werden.

Leuconostoc-Phagen aus Molkereiprobe wurden bereits umfassend beschrieben (Atamer et al., 2011; Ali et al., 2013; Kot et al., 2013; Kot et al., 2014b). Sie wurden aus Molke, Käse, Salzlake und Butter isoliert, typisiert und hinsichtlich ihrer thermi-

schen Inaktivierung charakterisiert. Vergleichsweise wenige Arbeiten finden sich dagegen zu den organoleptischen bzw. metabolomischen Veränderungen der Produkte, die durch eine Phageninfektion verursacht wurden. Samtlebe et al. (2012) konnten mit einem Sensorikversuch zeigen, dass eine Phageninfektion der *Leuconostoc*-Kulturen die organoleptischen Eigenschaften der fermentierten Milch beeinflusst. Arbeiten zu quantitativen Aromaveränderungen während der Milchfermentation und bei der Käseherstellung im Zusammenhang mit einer Bakteriophageninfektion sind dagegen nicht vorhanden. Somit war die Zielsetzung dieser Arbeit, Fermentationsversuche mit definierten Starterkulturen und *Leuconostoc*-Bakteriophagen durchzuführen, um so die negativen Effekte, die aus einer Phageninfektion der Aromakultur resultieren, besser beschreiben zu können. Weiterhin sollten Käsereiversuche im 100 l Maßstab durchgeführt werden, um einen möglichen Einfluss einer Phageninfektion auf die Aromaentwicklung während der Käsereifung zu untersuchen. Schließlich sollten die charakteristischen „Aroma-Fingerprints“ der hergestellten Sauermilch- und Käseproben durch eine klassische Sensorikprüfung und mittels einer elektronischen Nase analysiert werden.

5.2 Material und Methoden

5.2.1 Herstellung der fermentierten Milchprodukte

Der Einfluss einer Phageninfektion der Aromakultur auf die Aromaentwicklung wurde in den Testsystemen Sauermilch und Käse untersucht. Bei der Herstellung der Sauermilchproben wurden 100 ml H-Milch (1,5 % Fett) auf 30 °C temperiert und mit Milchsäurebakterien über 9-10 h fermentiert. Es wurden zwei verschiedene Fermentationen (Kontroll- und Testansatz) durchgeführt. Beide Ansätze wurden mit einem *L. lactis* Säuerungskulturstamm

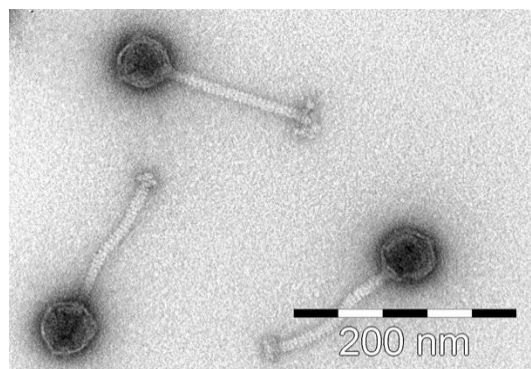


Abb. 5.1: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme des *Ln. pseudomesenteroides* Phagen P793.

und einem *Ln. pseudomesenteroides* Aromakulturstamm (10:1 Kulturenmix) 1 %ig beimpft. Bei dem Testansatz wurde jedoch direkt nach der Zugabe der Starterkultur die Milch mit dem *Ln. pseudomesenteroides* Phagen P793 (Abb. 5.1) infiziert. Die

eingesetzte Phagenkonzentration lag bei 10^6 PbE/ml, was einer MOI (*multiplicity of infection*) von ca. 1 entsprach. Die Versuchsansätze mit und ohne Phagenzusatz sind in der Tabelle 5.1 zusammengestellt.

Tabelle 5.1: Übersicht über die verwendeten Starterkulturenstämme in den Sauermilch- und Käse-Versuchsansätzen

	Kontrollansatz		Testansatz	
	Kultur	Konz.	Kultur	Konz.
Sauerer-milch 100 ml Milch	<i>L. lactis</i> Säuerungskultur: a. <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> Lc112-1 b. <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> 8/0-49 c. <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar. diacetylactis F7/2	90 %	<i>L. lactis</i> Säuerungskultur: a. <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> Lc112-1 b. <i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> 8/0-49 c. <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar. diacetylactis F7/2	90 %
	<i>Ln. pseudomesenteroides</i> Aromakultur BM2	10 %	<i>Ln. pseudomesenteroides</i> Aromakultur BM2	10 %
			<i>Ln. pseudomesenteroides</i> Phage P793	MOI=1
Käse 100 L Milch	O-Säuerungsstarterkultur Flora TM C160*	90 %	O-Säuerungsstarterkultur Flora TM C160*	90 %
	<i>Ln. pseudomesenteroides</i> Aromakultur BM2	10 %	<i>Ln. pseudomesenteroides</i> Aromakultur BM2	10 %
			<i>Ln. pseudomesenteroides</i> Phage P793	MOI=1

* Die O-Startersäuerungskultur enthält nur Laktokokkenstämme aber keine *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. diacetylactis oder *Leuconostoc*-Aromastämme.

Zur Herstellung von Käse vom Edamertyp (45 % Fett) wurden 100 l pasteurisierte Milch (Herkunft: Versuchsgut Schädtebek) eingesetzt und mit einem Starterkulturen-Mix von einer kommerziellen O-Säuerungsstarterkultur (FloraTM C160, Chr. Hansen GmbH) und einer *Ln. pseudomesenteroides* Aromakultur (BM2) beimpft. Auch hier wurden zwei verschiedene Modellkäse produziert. Während der Kontrollansatz lediglich mit der Starterkultur beimpft wurde, wurde bei dem Testansatz ähnlich wie bei den Sauermilchversuchen die Aromakultur mit dem *Leuconostoc*-Phagen P793 gezielt infiziert (Tabelle 5.1).

5.2.2 Bestimmung der Lebendkeimzahl und der Phagentiter

Die Bestimmung der *L. lactis* Lebendkeimzahlen erfolgte auf M17-Agar (versetzt mit 0,5 % Lactose und 0,1 % Glycin). Zur Bestimmung der *Ln. pseudomesenteroides* Lebendkeimzahlen wurde MRS-Agar (Adams, 1959) mit Vancomycin (100 µg/ml) verwendet, auf dem ausschließlich Vancomycin-resistente *Leuconostoc*-Kulturen wachsen können. Dabei wurde eine serielle Verdünnungsreihe von den Kulturen erstellt und jeweils 100 µl jeder Verdünnungsstufe in eine leere Petrischale pipettiert. Anschließend wurden ca. 12 – 15 ml des jeweiligen Agar (50 °C) mit in die Petrischa-

le gegeben und unter sanften Schwenken die Kultur in dem Agar verteilt. Inkubiert wurden die Platten bei 30 °C für 48 h.

Der Phagentiter wurde auf MRS-Agar bestimmt. Dabei wurden je 100 µl einer seriell-verdünnten Probe zur 300 µl *Leuconostoc* Kultur und 100 µl 40 mM CaCl₂ hinzugefügt, nach 10-min Adsorptionszeit mit 3 ml Weichagar (50 °C) vermischt und auf eine MRS-Unterschichtagarplatte gegossen (vgl. Kapitel 2.2.6.3). Die Platten wurden bei 30 °C für 24 Stunden inkubiert.

5.2.3 Elektronische Nase

Die elektronische Nase (PEN2, WMA Airsense Analytics, Inc., Schwerin) wurde konzipiert, um flüchtige organische Verbindungen und Gase zu messen und zu analysieren (Abb. 5.2) (Müller von Blumencron et al., 2015). Dazu gehört eine mit dem Erlenmeyerkolben verbundene Apparatur zur Entnahme des Dampfraumgases, ein mit dem Sensor-Array ausgestatteter Detektor und eine mit dem Computer verbundene Muster-Erkennungs-Software „WinMuster v.3.0“.



Abb. 5.2: (A) Elektronische Nase (Mitte) mit Probenmesskolben im Wasserbad (links) und EDV-Auswertung (rechts); (B) Gummipfropfen mit einer Kanüle zur Entnahme des Messgases.

Bei den Sensoren (Array) handelt es sich um 10 verschiedene Metalloxidsensoren (Tabelle 5.2) mit einer guten Selektivität für schwefelhaltige organische Komponenten, Methan, Wasserstoff, Alkohol und Kohlenwasserstoff. Das Messgas wurde über eine interne Pumpe angesaugt und über den Sensorarray geleitet. Mit einer zweiten Pumpe wurde gefilterte Referenzluft (Null-Luft) zum Sensorarray gebracht und dort zum Spülen des Systems genutzt. Die Sensorantwort wurde durch den elektrischen Widerstand (Ohm) der flüchtigen Komponenten angegeben. Die Betriebstemperatur

der Sensoren lag bei 300 °C (Lorenzen et al., 2013). Die Temperatur der elektronischen Nase (Gehäuse) erreichte eine Temperatur von 31-35 °C.

Tabelle 5.2: MOS-Sensoren der PEN2 (Quelle: Aisense Analytics, Schwerin; modif. nach MA Scholle, 2015)

Sensor-Nr.	Sensor-Bezeichnung	Allgemeine Beschreibung
1	W1C <i>aromatic</i>	aromatische Verbindungen
2	W5S <i>broadrange</i>	sehr empfindlich, breites Detektionsspektrum, Reaktion auf Stickoxide und Ozon sehr empfindlich mit negativem Signal
3	W3C <i>aromatic</i>	Ammoniak, aromatische Verbindungen
4	W6S <i>hydrogen</i>	vorwiegend Wasserstoff, selektiv (Atemgase)
5	W5C <i>arom-aliph</i>	Alkane, aromatische Verbindungen, weniger polare Verbindungen
6	W1S <i>broad-methane</i>	sensitiv für Methan (Umwelt) bei ca. 10 ppm, breites Detektionsspektrum, ähnlich zu Sensor Nr. 8
7	W1W <i>sulphur-organic</i>	Reaktion auf schwefelhaltige Verbindungen (H ₂ S 0,1 ppm), zudem sensitiv für viele Terpene und Organoschwefelverbindungen, die wichtig für den Geruch sind (u.a. Limonene, Pyrazine)
8	W2S <i>broad-alcohol</i>	detektiert Alkohole, partiell aromatische Verbindungen, breites Detektionsspektrum
9	W2W <i>sulphur-chlor</i>	aromatische Verbindungen, Organoschwefelverbindungen
10	W3S <i>methane-aliph</i>	reagiert auf hohe Konzentrationen >100 ppm, manchmal sehr selektiv für Methan

5.2.4 Versuchsaufbau

Vom Kontroll- und Testansatz wurden vier Sauermilchproben bzw. drei Käseproben analysiert. Die Einwaage der Proben erfolgte in einem 500 ml Erlenmeyerkolben zu je 10 g, wobei die Käseproben zuvor mit einer groben Küchenreibe zerkleinert wurden. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C gekühlt und erst 15 min vor der Messung in ein auf 25 °C temperiertes Wasserbad überführt. Die Kolben wurden mit einem Gummipfropfen (mit zwei Bohrungen für zwei Kanülen) abgedichtet (siehe Abb. 5.2). Eine Kanüle diente zur Verbindung zur Elektronischen Nase, die andere war mit einem Aktivkohlefilter ausgestattet und sorgte für die Zufuhr gefilterter Raumluft. Während der Messung wurde das Probengas aus den Kolben 49 s angesaugt und bei einer Flussrate von 400 ml/min über die Sensoren geleitet. Anschließend wurden die Sensoren regeneriert (Spülphase), indem die Umgebungsluft angesaugt und über die Aktivkohle gefiltert wurde. Dies erfolgte bei einer Flussrate von 600 ml/min. Nach 180 s erreichten die Sensorsignale wieder den Nullwert (Verhältnis von Leitwert G zu Leitwert G₀ entsprach 1) d.h. der elektrische Widerstand blieb konstant (Lorenzen et al., 2013).

Durch die Abkoppelung der Transferleitung vom Kolben während der Spülphase sollte verhindert werden, dass Komponenten des Dampftraumes in den Aktivkohlefilter gelangen und nachfolgende Messungen durch Kontamination verfälscht werden. Die Messung der Proben wurde in rotierender Reihenfolge durchgeführt (1.1; 2.1; 3.1; 4.1 – 1.2; 2.2; 3.2; 4.2 – usw.).

5.2.5 Sensorische Prüfung – Dreieckstest

Der Dreieckstest (auch Triangeltest) ist ein Differenztest (DIN ISO 4120) und wurde zur Überprüfung der sensorischen Unterschiede zwischen dem Kontrollansatz und dem Testansatz von Käse eingesetzt. Bei dem Test wurden drei Proben, die nach dem Zufallsprinzip mit dreistelligen Zahlen gekennzeichnet wurden, in Form eines Dreiecks aufgestellt. Zwei der drei Proben waren identisch und die abweichende Probe sollte ermittelt werden.

Die Käseproben wurden in gleichgroße Stücke geschnitten und in Gefäße (Petrischaale) gleicher Form und Farbe gelegt. Der Test wurde vom Prüfpanel mit 34 Teilnehmern durchgeführt. Die Ergebnisse wurden nach der DIN-Norm 4120 ausgewertet und es wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ festgelegt.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Einfluss einer *Leuconostoc* Phageninfektion auf die Aromaentwicklung in Sauermilch

Um die Aromaprofile der verschiedenen Sauermilchproben voneinander zu unterscheiden, wurde die Hauptkomponentenanalyse (PCA - *principal component analysis*) angewendet. Die PCA ist ein lineares Verfahren, welches genutzt wird umfangreiche Datensätze zu strukturieren und zu vereinfachen, indem eine Vielzahl statistischer Variablen auf eine geringere Zahl reduziert wird. Die Klassifizierung der Proben mittels PCA bezieht sich dabei nicht auf vorbestimmte Gruppen, sondern lediglich auf die Varianz des Datensatzes (Ampuero und Bosset, 2003). Die Ergebnisse einer PC-Analyse werden in Form eines PCA-Plots dargestellt. Dabei handelt es sich um ein einfaches Streudiagramm, wobei nah beieinanderliegende Punkte ähnliche Werte auf allen Sensoren aufweisen. Die Plots bilden die Messungen der Sensor-

antworten (G/G0) über den Messzeitraum von 30 bis 32 s (Plateau) ab und konnten stets eine Varianzerklärung des Datensatzes von mind. 90 % erzielen.

In der Abb. 5.3 ist ein PCA-Plot von verschiedenen Sauermilch-Fermentationsansätzen gezeigt, die mit einem *L. lactis* Stamm und einem *Ln. pseudomesenteroides* Stamm BM2 bzw. einem mit dem Phagen P793 infizierten BM2 Stamm beimpft wurden. Bei den *L. lactis* Stämmen handelte es sich um abwechselnd einen *L. lactis* ssp. *lactis* Stamm Lc112-1, *L. lactis* ssp. *cremoris* Stamm 8/0-49 und einen *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* Stamm F7/2. Die UHT-Milch diente bei der Darstellung der Proben als ein fester Kontrollbezugspunkt. Der PCA-Plot zeigt, dass alle Kontrollansätze ohne Phagenzugabe von den Testansätzen mit Phagenzugabe differenzierbar sind, wobei den Unterschieden auf der 1. Hauptachse (Varianz 92,81 %) eine größere Bedeutung beigemessen werden muss als den Unterschieden auf der 2. Hauptachse (Varianz 7,05 %). Der geringste Unterschied zwischen den Ansätzen mit und ohne Phagen konnte somit bei den Sauermilchproben beobachtet werden, die mit dem *L. lactis* ssp. *lactis* Stamm Lc112-1 angesäuert wurden (Abb. 5.3). Eine deutlichere Differenzierung wurde bei den Sauermilchansätzen (mit und ohne Phagen) festgestellt, die mit *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* F7/2 angesäuert wurden. Insgesamt konnte jedoch keine eindeutige Gruppierung aller drei phageninfizierten Ansätze erfolgen (siehe Abb. 5.3).

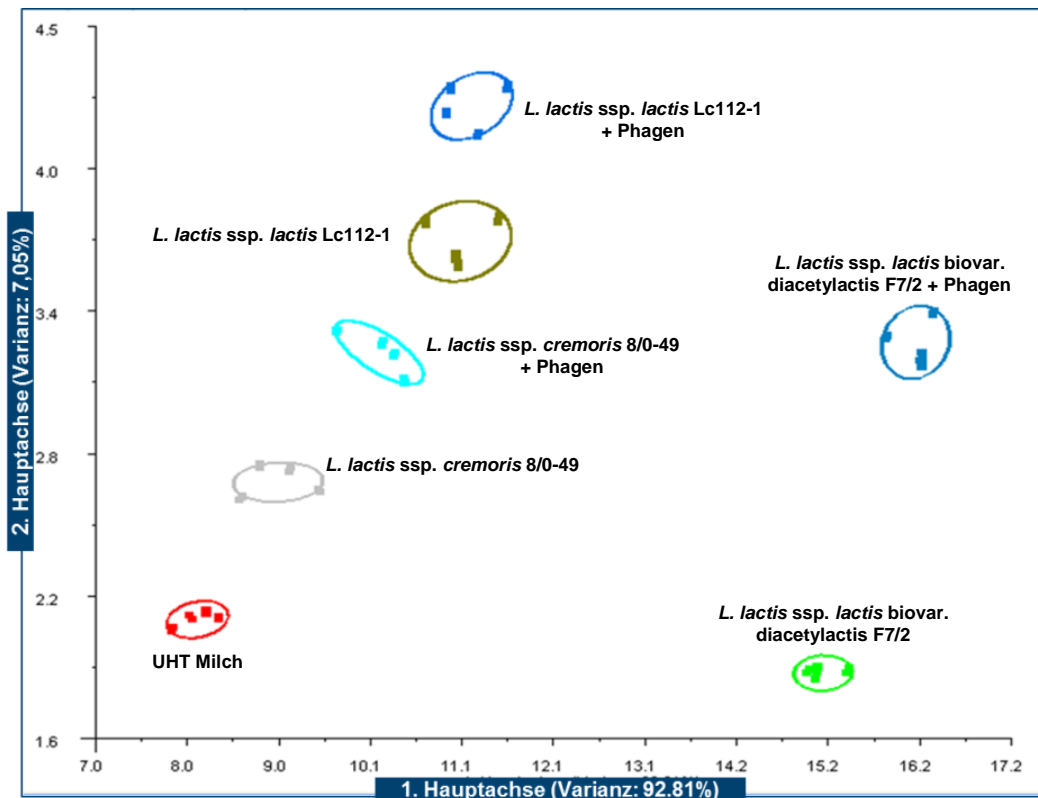


Abb. 5.3: PCA-Plot von verschiedenen Sauermilchansätzen mit UHT-Milch als Kontrollbezugspunkt. Die Ansätze wurden mit je einem *L. lactis* Stamm und *Ln. pseudomesenteroides* Stamm BM2 im Verhältnis 10:1 beimpft (s. Tabelle 1). Bei den Testansätzen wurde der *Ln. pseudomesenteroides* Stamm BM2 mit dem Phagen P793 infiziert. Anzahl der Messungen gleicher Probe (n) = 4.

Um die Entwicklung der Aromabestandteile über den gesamten Fermentationsverlauf zu erfassen, wurden der Kontrollansatz und der phageninfizierte Sauermilchansatz ab der Zugabe der Starterkultur alle 30 min mit der Elektronischen Nase analysiert. In der Abb. 5.4A ist die Entwicklung der Aromakomponenten in Sauermilchfermentationen über einen Zeitraum von 10 h dargestellt. Nach anfänglich gleichen Messergebnissen wurde eine Differenzierung zwischen dem Kontrollansatz (ohne Phagen - grün) und dem Testansatz (mit Phagen - rot) nach ca. sechs Stunden dokumentiert. Da die Differenzierung jedoch lediglich auf der 2. Hauptachse mit einer Varianz von 0,9 % zu verzeichnen ist, handelt es sich hierbei um einen sehr geringfügigen Unterschied zwischen den beiden Ansätzen. Berücksichtigt man jedoch lediglich die letzten 2,5 h der Fermentation, so ist ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Ansätzen zu verzeichnen (Abb. 5.4B). Der pH-Wert entwickelte sich ebenfalls parallel in den beiden Ansätzen und sank während der Ansäuerung von pH 6,6 in der Milch auf pH 5,4 nach sechs Stunden Fermentation und erreichte nach 10 h einen Wert von pH 4,6 in beiden Ansätzen (Abb. 5.5).

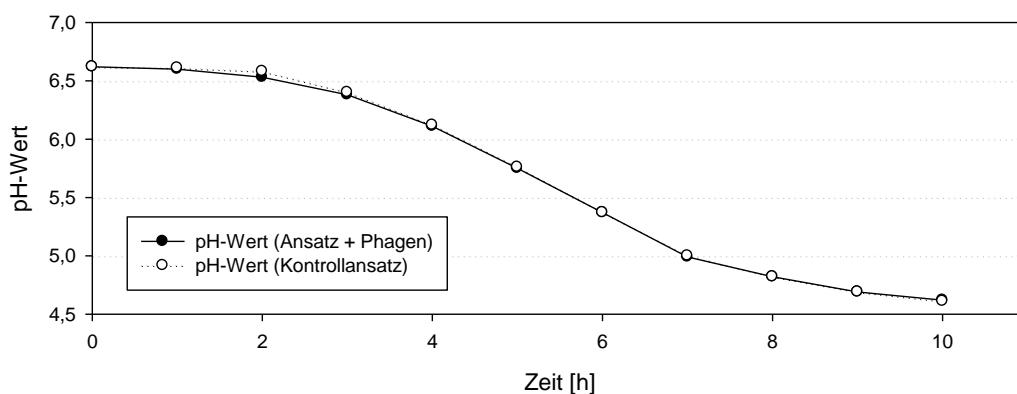
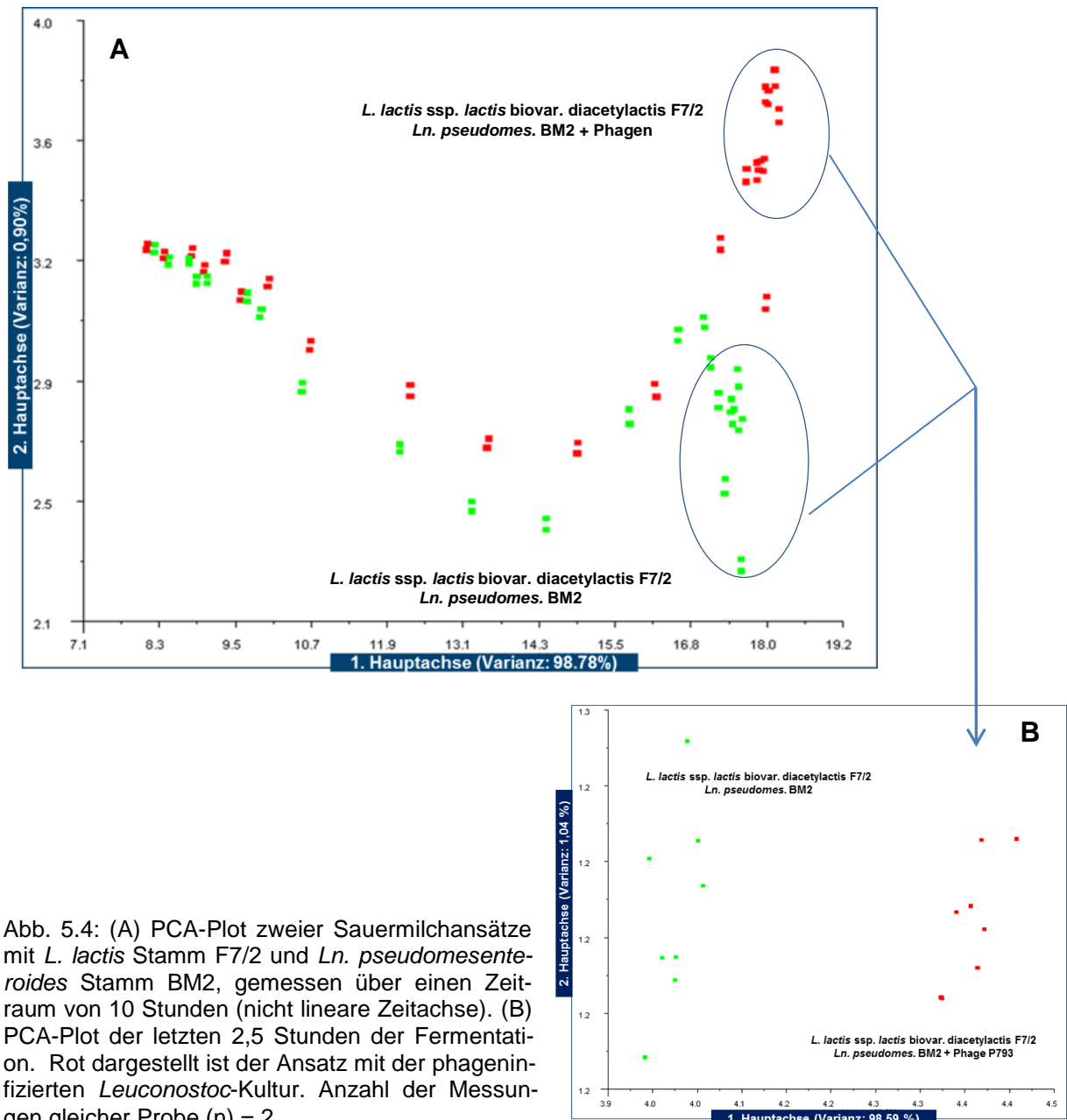


Abb. 5.5: pH-Wert-Verlauf von Sauermilchansätzen mit *L. lactis* Stamm F7/2 und *Ln. pseudomesenteroides* Stamm BM2, gemessen über einen Zeitraum von 10 h. Schwarz dargestellt ist der Ansatz mit der phageninfizierten *Leuconostoc*-Kultur.

Zusätzlich wurde die Entwicklung der Lebendkeimzahlen der *L. lactis* F7/2 und der *Ln. pseudomesenteroides* Kultur BM2, sowie der Titer des Phagen P793 über die Fermentationszeit von 10 h erfasst (Abb. 5.6). Da die Säuerungs- und Aromakultur in einem Verhältnis von 10:1 inokuliert wurden, betrug der Anfangskeimgehalt der Milch 2×10^7 KbE/ml für *L. lactis* Kultur und 2×10^6 KbE/ml für die *Leuconostoc* Kultur. Während die Keimzahl der *L. lactis* Kultur im Verlauf der Säuerung in beiden Ansätzen um 2 log-Stufen anstieg, sank die *Leuconostoc* Keimzahl in dem Testansatz mit Phagen bereits nach zwei Stunden auf 10^4 KbE/ml. Nach weiteren fünf Stunden war diese Kultur nahezu komplett von Phagen inaktiviert ($< 10^2$ PbE/ml). Im Vergleich dazu stieg die *Leuconostoc* Keimzahl in dem Kontrollansatz im Verlauf der Säuerung um ca. 0,8 log-Stufen an. Der Phagentiter stieg im Testansatz von 2×10^6 PbE/ml in der Milch nach bereits zwei Stunden auf 9×10^8 PbE/ml und blieb im Verlauf der weiteren Säuerung konstant.

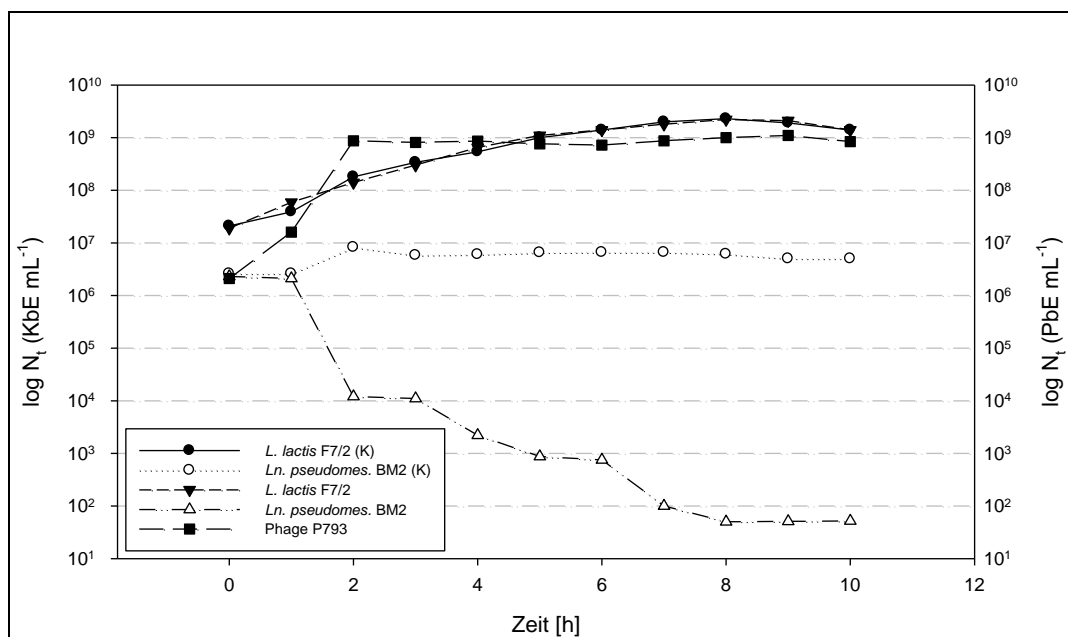


Abb. 5.6: Entwicklung der Keimzahlen in zwei Sauermilchproben (Kontrolle (K): ohne Phageninfektion) und der Phagentiter in einem Ansatz mit einer phageninfizierten Aromakultur.

5.3.2 Einfluss einer *Leuconostoc* Phageninfektion auf die Aromaentwicklung im Käse

Die Käsereiversuche wurden im kleinen Maßstab mit 100 l Milch durchgeführt und der hergestellte Käse anschließend mikrobiologisch und sensorisch untersucht.

5.3.2.1 Mikrobiologische Untersuchung

In der Abb. 5.7 sind die Lebendkeimzahlen der *L. lactis* FloraTM C160 und *Leuconostoc* BM2 Kulturen über einen Zeitraum von sechs Wochen dargestellt. Auffällig ist der deutliche Anstieg der Keimzahlen im Käse verglichen mit den Keimzahlen in der Milch (N_0). Der Anfangskeimgehalt im Käse (am Tag der Herstellung) betrug 2×10^9 KbE/g (1×10^7 KbE/ml Milch) für *L. lactis* Kultur und 8×10^6 KbE/g (1×10^6 KbE/ml Milch) für die *Leuconostoc* Kultur. Die Phagenkonzentration in dem Testansatz betrug dabei 3×10^6 PbE/g (1×10^6 PbE/ml Milch). Im Verlauf der 6-wöchigen Käsereifung kam es jedoch zu einer deutlichen Abnahme des *Ln. pseudomesenteroides* Keimgehalts in dem Testansatz auf 5×10^5 KbE/ml in Verbindung mit dem Anstieg der Phagenkonzentration auf 1×10^7 PbE/ml. Im Vergleich dazu stieg die *Leuconostoc* Keimzahl in dem Kontrollansatz von 1×10^6 KbE/ml in der Milch auf 2×10^7 KbE/g im Käse direkt nach der Herstellung und erreichte den höchsten Keimgehalt von 5×10^7 KbE/g nach 2 Wochen Reifezeit. Im Verlauf weiterer 4 Wochen Reifung kam es jedoch zu einem Abfall der Keimzahl auf ca. 1×10^7 KbE/g. Die *L. Lactis* Kultur verhielt sich in beiden Ansätzen nahezu identisch und fiel von einem Anfangskeimgehalt von 2×10^9 KbE/g auf 1×10^8 KbE/g bzw. 2×10^8 KbE/g nach 6 Wochen Reifezeit (s. Abb. 5.7).

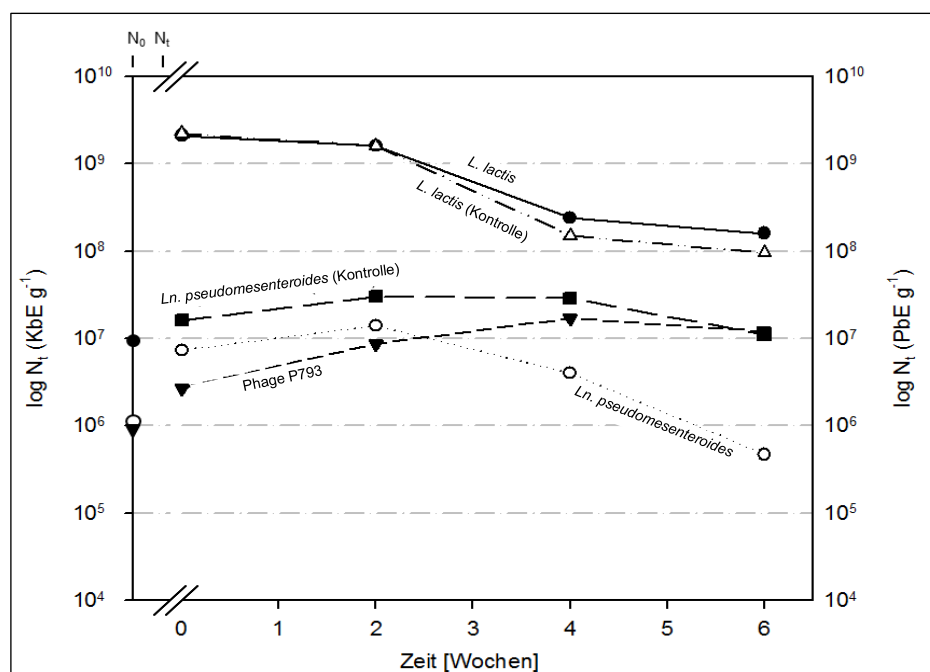
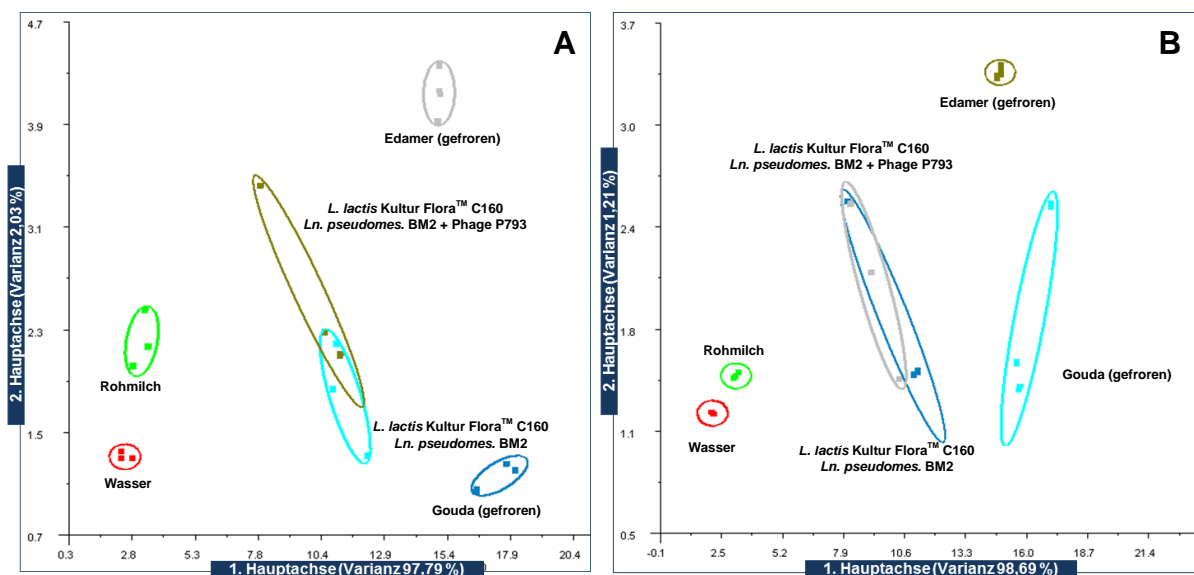


Abb. 5.7: Entwicklung der Keimzahlen für *Ln. pseudomesenteroides* Stamm BM2 und *L. lactis* Kultur FloraTM C160 sowie der P793-Phagentiter während der Käsereifung über 6 Wochen. Kontrolle: Ansatz ohne Phageninfektion. N_0 : Keimzahl der Milch; N_t : Keimzahl im Käse.

5.3.2.2 Sensorische Untersuchung – Elektronische Nase

Die Abb. 5.8 zeigt die mit der Elektronischen Nase gemessenen PCA-Plots der beiden Käseproben nach einem Tag (A), zwei Wochen (B), vier Wochen (C) und sechs Wochen (D) Reifezeit. Rohmilch und Wasser dienten dabei als fixe Bezugspunkte für die Anordnung der Probenmesspunkte. Die beiden aus dem örtlichen Fachhandel bezogenen Käsereferenzproben (Edamer und Gouda) wurden zum Zeitpunkt der Käseherstellung gerieben und eingefroren und wurden ebenfalls als feste Bezugspunkte bei jeder Messreihe mit aufgenommen. Die PCA-Plots zeigen deutlich, dass sowohl kurz nach der Herstellung als auch im Verlauf der Reifung kein eindeutiger Unterschied zwischen den beiden Proben mittels elektronischen Nase festgestellt werden konnte, obwohl eine deutliche phagenbedingte Abnahme der *Leuconostoc* Keimzahl in dem Testansatz stattgefunden hatte.



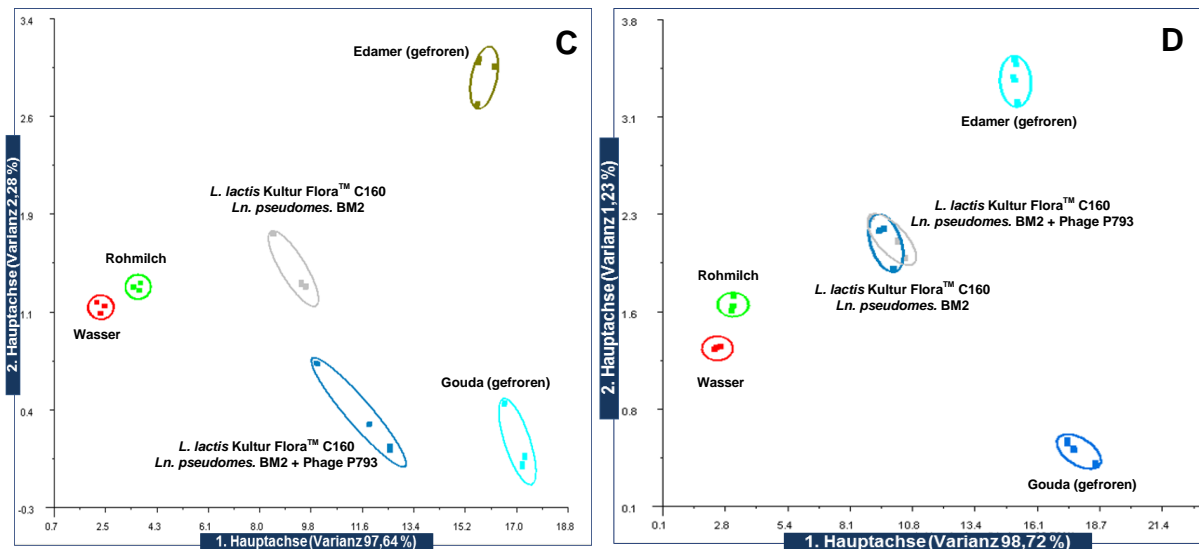


Abb. 5.8: PCA-Plots der Käseproben, die mit einer *L. lactis* O-Starterkultur Flora™ C160 und mit dem *Ln. pseudomesenteroides* Stamm BM2 produziert wurden. Bei der grau markierten Probe wurde der *Leuconostoc* Stamm mit dem Phagen P793 infiziert. Die PCA-Plots wurden nach 1 Tag (A), 2 Wochen (B), 4 Wochen (C) und 6 Wochen (D) Reifezeit erfasst. Kontrollbezugspunkte: Wasser, Rohmilch, Gouda und Edamer aus dem Einzelhandel. Anzahl der Messungen gleicher Probe (n) = 3.

5.3.2.3 Sensorische Untersuchung – Dreieckstest

Die sensorische Untersuchung der Käseproben wurde nach 6 Wochen Reifezeit durchgeführt. An der Prüfung nahmen 34 Personen teil. Die Mindestanzahl der benötigten korrekten Antworten für die Feststellung eines signifikanten Unterschieds der Probe lag bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % bei 17 Antworten (laut DIN ISO 4120). Wie der Abb. 5.9 zu entnehmen, konnte das Sensorikpanel einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Proben (mit und ohne Phageninfektion) feststellen und damit bestätigen, dass eine Phageninfektion der *Leuconostoc* Kultur zu Aromaveränderungen im Endprodukt führt.

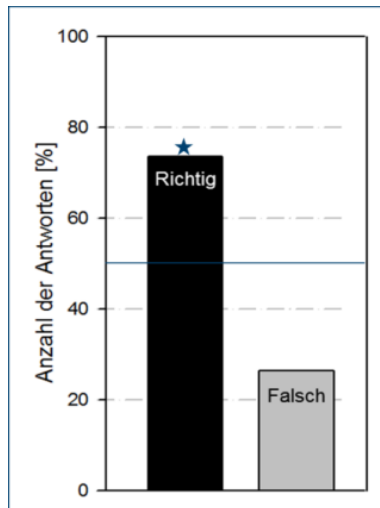


Abb. 5.9: Anzahl positiver und negativer Antworten bei der sensorischen Prüfung (Dreieckstest) von Käse mit 34 Teilnehmern. Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,05$, (Linie) Signifikanzlevel, (•) signifikanter Unterschied (nach DIN ISO 4120).

5.4 Diskussion

Die Ansäuerung der Milch durch unterschiedliche *L. lactis* Stämme zeigte eine sehr geringe Differenzierbarkeit der Ansätze bei den Untersuchungen mittels Elektronischer Nase. Da die x-Achse der PCA-Plots den Hauptteil der Varianz erklärt, unterscheiden sich die Ansätze, die auf der x-Achse weit voneinander liegen, stärker als die Ansätze mit weiten Abständen auf der y-Achse. Die beiden Sauermilchansätze, die mit den Stämmen *L. lactis* ssp. *lactis* Lc112-1 und *L. lactis* ssp. *cremoris* 8/0-49 angesäuert wurden, liegen auf der x-Achse sehr nah beieinander und sind folglich ähnlich in der Zusammensetzung der gemessenen Komponenten. Lediglich der Ansatz mit dem *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* F7/2 Stamm zeigte eine deutliche Varianz zu den beiden Stämmen. Dies ist dadurch zu erklären, dass die *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* Stämme, Aromastoffe wie α -Acetolactat, Diacetyl, Acetoin und Butanediol bilden können (Hugenholtz et al., 1993). Dazu sind jedoch in den anderen Ansätzen lediglich die *Leuconostoc*-Stämme in der Lage. Betrachtet man nur alle phageninfizierten Ansätze, so konnte keine eindeutige Gruppierung dieser erfolgen. Erneut ist der größte Unterschied in der Probe mit dem des *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* zu sehen, da dieser ebenfalls Aromastoffe bilden konnte.

Die 10-stündige Untersuchung (alle 30 min) des Fermentationsverlaufs von dem Sauermilchansatz mit dem *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* F7/2 Stamm sollte Informationen über den Zeitpunkt liefern, ab dem die ersten Unterschiede in der Entwicklung der Aromabestandteile mittels Elektronischer Nase messbar sind. Nach ca. 6 h wurde die erste Varianz zwischen den Ansätzen mit und ohne Phagen festge-

stellt. Der pH-Wert lag zu diesem Zeitpunkt bei 5,4. Dies entsprach dem pH-Optimum der Aromastoffbildung (z.B. Diacetyl), welches im Bereich von 5,2 bis 5,5 liegt (Vedamuthu, 1994). Somit ist anzunehmen, dass nach ca. 6 h Säuerung vermehrt Aromakomponenten gebildet wurden. Da die Unterschiede bei der PCA hauptsächlich auf der y-Achse zu verzeichnen sind, die lediglich 0,9 % der Varianz erklärt, ist hier von einem sehr geringen Unterschied auszugehen. Erneut kann dies auf die zusätzliche Aromastoffbildung des *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* Stammes zurückgeführt werden.

Die pH-Werte der beiden Ansätze haben sich im Verlauf der Säuerung nahezu identisch entwickelt (von 6,6 auf 4,6), was sich in der parallelen Entwicklung der *L. lactis* Säuerungskulturen zeigt. Dies bestätigen frühere Arbeiten, wonach die Säuerung der Milch von einer phageninfizierten Aromakultur nicht beeinflusst wird (Hemme & Foucaud-Scheunemann, 2004). Die *Leuconostoc* Keimzahl in dem Phagenansatz, sowie der Phagentiter, entwickelten sich dagegen in entgegengesetzte Richtungen. Der Phagentiter stieg in den ersten zwei Stunden um 2,6 log-Stufen und blieb anschließend konstant, während die *Leuconostoc* Keimzahl im Verlauf der Säuerung kontinuierlich abfiel. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass nicht alle Bakterien gleichzeitig von den Bakteriophagen infiziert werden (Neve, 1996). Fermentationsansätze stellen ein statisches System dar, in dem Phagen von einem zufälligen Treffen mit einer Wirtszelle abhängig sind (Heller et al., 2011). Weiterhin kann bei einer MOI von 1 rechnerisch ein Phage eine Bakterienzelle infizieren. Eine Bakterienzelle kann jedoch von mehreren Phagen gleichzeitig befallen werden (Neve, 1996; Heller et al., 2011), wodurch erst durch eine spätere Freisetzung neuer Phagenpartikel wiederholt *Leuconostoc*-Zellen infiziert werden können. Außerdem ist bekannt, dass bei einigen Bakteriophagen (z.B. T4-Phagen) die Verzögerung der Zelllyse durch eine „Lyse-Inhibition“ verursacht werden kann. Diese tritt ein, wenn eine infizierte Zelle durch einen weiteren Phagen reinfiziert bzw. „superinfiziert“ wird. Die Zelllyse kann daraufhin um mehrere Stunden verzögert werden (Dressman & Drake, 1999).

Bei dem Testsystem Käse wurden die mikrobiologischen Parameter, zusammen mit der Analyse mittels Elektronischen Nase, alle zwei Wochen im Verlauf der 6-wöchigen Reifezeit untersucht. Auffällig ist, dass obwohl eine deutliche phagenbedingte Abnahme der *Leuconostoc* Keimzahl in dem Testansatz stattgefunden hat und somit auch von einer mangelnden Aromaausbildung auszugehen ist, kein durchgän-

giger Unterschied zwischen den beiden Käseansätzen im Verlauf der Reifung mittels elektronischer Nase festgestellt werden konnte. Während der Käsereifung werden im Rahmen der Lipolyse, Glykolyse und Proteolyse flüchtige Aromakomponenten gebildet (McSweeney, 1997; Urbach, 1997). Die wichtigsten Geruchskomponenten sind dabei Verbindungen wie Methylketone, Fettsäuren, Phenole, Schwefelverbindungen, Terpene, α -Dicarbonyl, Ester, Lactone sowie Amine und andere stickstoffhaltige Verbindungen (Urbach, 1997). Viele dieser Verbindungen werden von dem Detektionsspektrum der Elektronischen Nase erfasst (Scholle, 2015). Die fehlende Unterscheidung der Ansätze muss folglich durch weitere Einflussfaktoren erklärt werden. Dies könnten die auf die Sensoren einwirkenden Umgebungseinflüsse sein, wie beispielsweise Feuchtigkeit oder die in dem Messraum herrschende, stets unterschiedliche Umgebungstemperatur, welche zu Messabweichungen durch Nullpunktverschiebungen geführt haben könnten (Ampuero und Bosset, 2003). Zudem ist bereits für andere Käsesysteme gezeigt worden, dass die Lyse der Starterbakterien während der Käsereifung zum Aroma beitragen kann (Lepeuple et al., 1998; O'Sullivan et al., 2000). Somit könnte die geringe Lebendkeimzahl die phagenbedingte Lyse der *Leuconostoc* Kulturen bis zu einem gewissen Grad kompensieren. Im Unterschied zu der elektronischen Nase konnte das 34-köpfige Sensorikpanel einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Käseansätzen sensorisch erfassen. Die Vergleichbarkeit der Humansensorik mit der Analyse mittels elektronischer Nase ist sehr schwierig, denn während die elektronische Nase mit einer mittleren, semi-selektiven Messempfindlichkeit versehen ist, ist das menschliche Geruchs- und Geschmackssinn nicht nur substanzabhängig, sondern auch sehr sensitiv und selektiv (Scholle, 2015; James et al., 2005; Malnic et al., 1999). Zusätzlich kann die elektronische Nase auch geruchlose Substanzen erfassen (Boeker, 2010). Sie ist jedoch nicht in der Lage, im Unterschied zum menschlichen Geruchssinn, Geruchsstoffe unterschiedlich zu gewichten (Boeker, 2010). Dies macht die Vergleichbarkeit der Messungen mittels elektronischer Nase und humansensorischen Organen nahezu unmöglich.

5.5 Schlussfolgerungen

Die Untersuchungen zum Einfluss einer *Leuconostoc* Phageninfektion auf die Aromaentwicklung in Sauermilch und Käse sowie auf das organoleptische Profil von Kä-

se zeigten, dass in komplexen Starterkulturen (Säuerungskulturen und *Leuconostoc*-Aromakulturen) eine Phageninfektion der *Leuconostoc* Aromakultur einen nachweisbaren Einfluss auf das Aromaprofil fermentierter Milchprodukte wie Sauermilch und Käse hat. Die Infektion der Aromakultur kann jedoch im Fermentationsprozess zunächst unerkannt bleiben, da die Säuerungskultur nicht von der Phageninfektion betroffen ist. Weiterhin zeigte sich, dass die elektronische Nase geeignet ist, phagenbedingte Veränderungen im Aromaprofil von Sauermilchproben zu erfassen. In den Edamerproben ließen sich Aromaunterschiede mit der elektronischen Nase jedoch nicht nachweisen. Allerdings konnten phagenbedingte Veränderungen in der Aromaentwicklung der Edamerkäse nach 6 Wochen Reifungszeit von einem Sensorikpanel signifikant nachgewiesen werden.

Zusammenfassung

In milchverarbeitenden Betrieben sind die Starterkulturen durch Bakteriophageninfektionen gefährdet, woraus Fermentationsstörungen, Aroma- und Texturdefekte resultieren können. Vor allem die hohe Thermoresistenz einiger *Lactococcus lactis* Phagen (936 Gruppe) führt dazu, dass diese durch die übliche Pasteurisation nicht ausreichend inaktiviert werden. Durch die Rückführung von Molkenbestandteilen und Molkenpulver in den Fermentationsprozess kann es folglich zu einer Anreicherung von Phagen kommen.

Aus diesem Grund wurden insgesamt 13 Molkenpulver aus unterschiedlichen Betrieben und 10 Molkenpulverformulierungen auf Bakteriophagen untersucht (Kapitel 2). Es wurden sowohl Phagen gegen säurebildende *L. lactis* und *Streptococcus thermophilus* Stämme, als auch gegen aromabildende *Leuconostoc pseudo-/mesenteroides* Stämme in Titern von bis zu 6×10^7 Plaque-bildenden Einheiten (PbE) pro g Molkenpulver nachgewiesen. Das Screening dieser Phagen auf thermische Stabilität ergab, dass 88 % der untersuchten *L. lactis* Phagen eine Erhitzung bei 80 °C für 5 min überstehen konnten. Es wurde ein besonders hitzeresistenter *L. lactis* Phage identifiziert (Phage P956). Zudem wurde eine bemerkenswert hohe Stabilität von Phagen in Molkenpulvern während einer Lagerzeit von 4 Jahren dokumentiert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Untersuchungen zur Thermostabilität der *L. lactis* Phagen bei Erhitzung in einer Pilot-Pasteurierungsanlage durchgeführt, um das Inaktivierungsverhalten der Phagen mit den Inaktivierungsergebnissen unter Laborbedingungen vergleichen zu können (Kapitel 3). Dabei wurden sowohl thermoresistente *L. lactis* Phagen (P680, P1532, P635) als auch der thermosensitive Phage P008 eingesetzt. Alle Phagen ließen sich in der Pilot-Pasteurierungsanlage effizienter inaktivieren und wiesen deutlich niedrigere *D*-Werte auf als in den Laborversuchen.

Im dritten Teil der Arbeit wurde eine Cross-Flow-Membranfiltration getestet, mit der es möglich sein sollte, den Phagentiter in Molke zu reduzieren ohne dabei Molkenproteine zu denaturieren (Kapitel 4). Es konnte eine gute Phagenretention bei gleichzeitig guter Molkenproteinpermeation mittels Membranfiltration erreicht werden, wobei Membranen mit einer Trenngrenze von 300 kDa den besten Kompromiss hinsichtlich der Phagenretention (3,7 log Einheiten) und Molkenproteinpermeation (α -LA ca. 40 % und β -LG ca. 60 %) darstellten. Neben der Porengröße der Membran war

die Phagenmorphologie ein weiterer wichtiger Faktor, da v. a. Phagen mit sehr großem Kapsid (KSY1) bei der Membranfiltration besser zurückgehalten wurden. Die Schwanzlänge der Phagen hatte dagegen keinen signifikanten Einfluss. Die Wirksamkeit der Phagenfiltration wurde auch durch die Pasteurisation der Molke unter Zusatz von ebenfalls pasteurisierten Bakterien verbessert, da diese eine Fouling-schicht auf der Membran ausbilden konnten. Die Phagenretention (bei akzeptabler Molkenproteinpermeation) ließ sich auch verbessern, wenn mechanisch hergestellte Bakterienzelltrümmer der Molke zugesetzt wurden.

Im vierten Teil der Arbeit wurden Untersuchungen zum Einfluss einer *Leuconostoc* Phageninfektion auf die Aromaentwicklung sowie auf das organoleptische Profil von Sauermilch und Käse durchgeführt (Kapitel 5). Diese hatte bei der Verwendung von Startermischkulturen (mit *L. lactis* und *Leuconostoc* Stämmen) einen signifikanten Einfluss auf das Aromaprofil der fermentierten Milchprodukte. Ein 34-köpfiges Sensorikpanel konnte die phagenbedingten Veränderungen in der Aromaausbildung im Edamerkäse nach 6 Wochen Reifungszeit nachweisen. Phagenbedingte Veränderungen im Aromaprofil von Sauermilchproben konnten auch mit einer elektronischen Nase erfasst werden, allerdings war dies nicht in den Käseproben möglich.

Summary

Bacteriophage infections of starter cultures are common in dairies, causing fermentation failures or delays and/or flavor and texture defects. Several *Lactococcus lactis* (936 group) phages reveal high thermal stability and cannot be inactivated by standard pasteurization conditions. Consequently, recycling of whey components and whey powders in fermentation processes can lead to accumulation of phages. A representative set of 13 whey powders and 10 whey powder formulations were examined for the presence of bacteriophages. Phages for acid-producing *L. lactis* and *Streptococcus thermophilus* strains, as well as for flavor-producing *Leuconostoc pseudo-/mesenteroides* strains were detected in titers up to 6×10^7 plaque-forming units (pfu) per g powder. When these phages were screened for thermal stability, 88% of the *L. lactis* phages did survive a 5-min heat treatment at 80 °C. Highest heat stability was documented for lactococcal phage P956. The *L. lactis* phages revealed a remarkably high stability during long-term storage in the powders over 4 years.

In the third chapter, thermal resistance of *L. lactis* phages was analyzed in a pilot-plant pasteurizer in order to compare their inactivation kinetics with those obtained in test tubes in the laboratory. Three *L. lactis* phages with high thermal stability (P680, P1532, P635) as well as phage P008 (sensitive to thermal treatments) were used for these experiments. For all phages, thermal inactivation was significantly more effective in the pilot-plant pasteurizer than in laboratory experiments, and distinctly lower *D*-values were determined.

In the fourth chapter, cross-flow membrane filtration of phages in whey was tested for its potential to i) achieve appropriate phage retention and ii) simultaneously acceptable whey protein permeation. Membrane cut-offs of 300 kDa represented the best compromise regarding phage retention (3.7 log units) and whey protein permeation (α -LA approx. 40% and β -LG approx. 60%). Phage morphology was also a critical factor, as phage retention was higher for phage possessing large capsid (KSY1). However, retention of phages with tails of different length was not influenced by this morphological characteristic. The efficiency of phage removal by membrane filtration could be increased by adding inactivated (by pasteurization) bacterial host cells to the whey spiked with phages, as these cells formed a fouling layer on the membranes. The same effect (i.e., sufficient phage retention and whey protein permeability) was similarly achieved with cell debris obtained from mechanical disruption of the host cells.

In chapter 5, the influence of *Leuconostoc* phage infection on the development of flavor and organoleptic profiles of sour milk and cheese was investigated. When using a blend of *L. lactis* and *Ln. pseudomesenteroides* strains as mixed starter culture, phage infection of the *Leuconostoc* culture resulted in a distinct altered flavor and organoleptic profile of these fermented milk products. In sour milk, these phage-induced changes could also be detected by an electronic nose apparatus. However, in cheese samples (after 6 weeks of ripening), the phage-derived differences on the flavor profiles could not be detected by the electronic nose, but were still noticed by a sensory panel.

Literaturverzeichnis

- Ackermann, H.W. (2011): Bacteriophage taxonomy. *Microbiology Australia*, 32: 90-94.
- Ackermann, H.W., Cantor, E.D., Jarvis, A.W., Lembke, J. & Mayo, J.A. (1984): New species definitions in phages of Gram-positive cocci. *Intervirology*, 22: 181-190.
- Ackermann, H.W. & Eisenstark, A. (1974). The present state of phage taxonomy. *Intervirology*, 3: 201-219.
- Adams, M. (1959). Bacteriophages. New York, USA: Interscience Publishers.
- Aksyuk, A.A., Leiman, P.G., Kurochkina, L.P., Shneider, M.M., Kostyuchenko, V.A., Mesyanzhinov, V.V. & Rossmann, M.G. (2009). The tail sheath structure of bacteriophage T4: a molecular machine for infecting bacteria. *The EMBO Journal*, 28: 821-829.
- Ali, Y., Kot, W., Atamer, Z., Hinrichs, J., Vogensen, F.K., Heller, K.J., Neve, H. (2013). Classification of lytic bacteriophages attacking dairy *Leuconostoc* starter strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 79: 3628-3636.
- Alisky, J., Iczkowski, K., Rapoport, A. & Troitsky, N. (1998). Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. *Journal of Infection*, 36: 5-15.
- Almécija, M.C., Ibáñez, R., Guadix, A. & Guadix, E.M. (2007). Effect of pH on the fractionation of whey proteins with a ceramic ultrafiltration membrane. *Journal of Membrane Science*, 288: 28-35.
- Ampuero, S. & Bosset, J.O. (2003). The electronic nose applied to dairy products: a review. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 94: 1-12.
- Anany, H., Chen, W., Pelton, R. & Griffiths, M.W. (2011). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in meat by using phages immobilized on modified cellulose membranes. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 6379-6387.
- Atamer, Z., & Hinrichs, J. (2010). Thermal inactivation of the heat-resistant *Lactococcus lactis* bacteriophage P680 in modern cheese processing. *International Dairy Journal*, 20: 163-168.
- Atamer, Z., Ali, Y., Neve, H., Heller, K.J. & Hinrichs, J. (2011). Thermal resistance of bacteriophages attacking flavour-producing dairy leuconostoc starter cultures. *International Dairy Journal*, 21: 327-334.
- Atamer, Z., Samtlebe, M., Neve, H., Heller, K.J. & Hinrichs, J. (2013). Review: elimination of bacteriophages in whey and whey products. *Frontiers in Microbiology*, 4: 191.

- Atamer, Z., Dietrich, J., Müller-Merbach, M., Neve, H., Heller, K.J., & Hinrichs, J. (2009). Screening for and characterization of *Lactococcus lactis* bacteriophages with high thermal resistance. *International Dairy Journal*, 19: 228-235.
- Atamer, Z., Neve, H., Heller, K.J. & Hinrichs, J. (2012). In: Bacteriophages in dairy processing (Quiberoni & Reinheimer, eds), pp. 195-214, Nova Publishers, Hauppauge, NY, USA.
- Atra, R., Vatai, G., Bekassy-Molnar, E. & Balint, A. (2005). Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. *Journal of Food Engineering*, 67: 325-332.
- Autenrieth, I.B., Bergheim, I., Blank, R., Blaut, M. & Bischoff, S.C. (2009). Probiotika, Präbiotika und Synbiotika: Thieme-Verlag, Stuttgart.
- Bakhshayeshi, M., Jackson, N., Kuriyel, R., Mehta, A., van Reis, R. & Zydney, A.L. (2011). Use of confocal scanning laser microscopy to study virus retention during virus filtration. *Journal of Membrane Science*, 379: 260-267.
- Bebeacua, C., Lai, L., Vegge, C.S., Brøndsted, L., van Heel, M., Velesler, D. & Cambillau, C. (2013). Visualizing a complete *Siphoviridae* member by single-particle electron microscopy: the structure of lactococcal phage TP901-1. *Journal of Virology*, 87:1061-1068.
- Belitz, H.-D. & Grosch, W. (1987): Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin.
- Bilgelow, W.D. (1921). The logarithmic nature of thermal death time curves. *The Journal of Infectious Diseases*, 29: 528-536.
- Binetti, A.G., Quiberoni, A. & Reinheimer, J.A. (2002). Phage adsorption to *Streptococcus thermophilus*: Influence of environmental factors and characterization of cell-receptors. *Food Research International*, 35: 73-83.
- Bissonnette, F., Labrie, S., Deveau, H., Lamoureux, M. & Moineau, S. (2000). Characterization of mesophilic mixed starter cultures used for the manufacture of aged cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 83: 620-627.
- Boeker, P. (2010). Elektronische Nasen: das methodische Konzept und seine Problematik. *Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft*, 70: 314–320.
- Bogosian G. Control of bacteriophage in commercial microbiology and fermentation facilities. In Calendar R (ed) *The Bacteriophages*, 2nd edition, pp. 667-673. Oxford University Press, NY, 2006.
- Boizet, B., Mata, M., Mignot, O., Ritzenthaler, P. & Sozzi, T. (1992). Taxonomic characterization of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc oenos* bacteriophage. *FEMS Microbiology Letters*, 90: 211-216.

- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarne, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D. & Sorokin, A. (2001): The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Research*, 11: 731-53.
- Bradley, D.E. (1967). Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriological reviews*, 31: 230-314.
- Breitbart, M. & Rohwer, F. (2005). Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends in Microbiology*, 13: 278-284.
- Brøndsted, L., Ostergaard, S., Pedersen, M., Hammer, K. & Vogensen, F.K. (2001). Analysis of the complete DNA sequence of the temperate bacteriophage TP901-1: evolution, structure, and genome organization of lactococcal bacteriophages. *Virology*, 283: 91-109.
- Brown, R.J. & Ernstrom, C.A. (1982). Incorporation of ultrafiltration concentrated whey solids into cheddar cheese for increased yield. *Journal of Dairy Science*, 65: 2391-2395.
- Brüssow, H. (2012). What is needed for phage therapy to become a reality in Western medicine? *Virology*, 434: 138-142.
- Brüssow, H., Fremont, M., Bruttin, A., Sidoti, J., Constable, A. & Fryder, V. (1994): Detection and classification of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from industrial milk fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 4537-4543.
- Çakır-Fuller, E. (2015). Enhanced heat stability of high protein emulsion systems provided by microparticulated whey proteins. *Food Hydrocolloids*, 47: 41-50.
- Campbell, N.A. & Reece, J.B. (2009). Biologie. 8. Auflage, Pearson Verlag, München.
- Capra, M.L., Quiberoni, A., & Reinheimer, J.A. (2004). Thermal and chemical resistance of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* bacteriophages. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 499-504.
- Capra, M.L., Neve, H., Sorati, P.C., Atamer, Z., Hinrichs, J., Heller, K.J., & Quiberoni, A. (2013). Extreme thermal resistance of phages isolated from dairy samples: Updating traditional phage detection methodologies. *International Dairy Journal*, 30: 59-63.
- Chibani-Chennoufi, S., Dillmann, M.L., Marvin-Guy, L., Rami-Shojaei, S. & Brüssow, H. (2004). *Lactobacillus plantarum* bacteriophage LP65: a new member of the SPO1-like genus of the family *Myoviridae*. *Journal of Bacteriology*, 186: 7069-7083.
- Chick, H. (1908). An investigation of the laws of disinfection. *The Journal of Hygiene*, 8: 92-158.

- Choi, J., Kotay, S.M. & Goel, R. (2010). Various physico-chemical stress factors cause prophage induction in *Nitrosospira multiformis* 25196 - an ammonia oxidizing bacteria. *Water Research*, 44: 4550-4558.
- Choińska-Pulit, A., Mituła, P., Śliwka, P., Łaba, W. & Skaradzińska, A. (2015). Bacteriophage encapsulation: Trends and potential applications. *Trends in Food Science and Technology*, 45: 212-221.
- Chopin, A., Bolotin, A., Sorokin, A., Ehrlich, S.D. & Chopin, M. (2001). Analysis of six prophages in *Lactococcus lactis* IL1403: different genetic structure of temperate and virulent phage populations. *Nucleic Acids Research*, 29: 644-651.
- Chopin, A., Deveau, H., Ehrlich, S.D., Moineau, S. & Chopin, M.C. (2007). KSY1, a lactococcal phage with a T7-like transcription. *Virology*, 365: 1-9.
- Chopin, M.-C. (1980). Resistance of 17 mesophilic lactic *Streptococcus* bacteriophages to pasteurization and spray-drying. *Journal of Dairy Research*, 47: 131-139.
- Clokier, M.R., Millard, A.D., Letarov, A.V. & Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage*, 1: 31-45.
- Cogan, T.M. & Jordan, K.N. (1994). Metabolism of *Leuconostoc* bacteria. *Journal of Dairy Science*, 77: 2704-2717.
- d'Hérelle, F. (1917). On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli. *Comptes Rendus Academie des Sciences*, 165: 373-375.
- d'Herelle, F. (1930). The bacteriophage and its clinical applications. Baillière, Tindall & Cox, London, UK.
- Daly, C., Fitzgerald, G.F. & Davis, R. (1996). Biotechnology of lactic acid bacteria with special reference to bacteriophage resistance. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 99-110.
- de Man, J.D., Rogosa, M. & Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23: 130-135.
- Deveau, H., Labrie, S.J., Chopin, M.-S. & Moineau, S. (2006). Biodiversity and classification of lactococcal phages. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 4338-4346.
- Davey, G.P., Ward, L.J.H. & Brown, J.C.S. (1995). Characterization of four *Leuconostoc* bacteriophages isolated from dairy fermentations. *FEMS Microbiology Letters*, 128: 21-25.
- de Wit, J.N. (1998). Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science*, 81: 597-608.

- DIN ISO (4120 : 995-01) Sensorische Analyse – Prüfverfahren - Dreiecksprüfung. Beuth Verlag, Berlin.
- Dogan, Z., & Hinrichs, J. (2008). Risk of fermentation failure due to the presence of thermoresistant *Lactococcus lactis* bacteriophages. *Milchwissenschaft*, 63: 374-377.
- Dressman, H.K. & Drake, J.W. (1999). Lysis and lysis inhibition in bacteriophage T4: *rV* mutations reside in the holin *t* gene. *Journal of Bacteriology*, 181: 4391-4396.
- Farley, M.M., Tu, J., Kearns, D.B., Molineux, I.J. & Liu, J. (2016). Ultrastructural analysis of bacteriophage Phi29 during infection of *Bacillus subtilis*. *Journal of Structural Biology*, 16: 1047-8477.
- Fernandez-Garayzabal, J.F., Dominguez-Rodriguez, L., Vazquez-Boland, J.A., Rodriguez-Ferri, E.F., Briones-Dieste, V., Blanco-Cancelo, J.L. & Suarez-Fernandez, G. (1987). Survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk treated in a pilot plant size pasteurizer. *Journal of Applied Bacteriology*, 63: 533-537.
- Fogg, P., Colloms, S., Rosser, S., Stark, M. & Smith, M.C. (2014). New applications for phage integrases. *Journal of Molecular Biology*, 426: 2703-2716.
- Fox, P.F. (2004). Cheese. Chemistry, physics and microbiology. 3. ed. Amsterdam: Elsevier Academic.
- Fuchs, G., Schlegel, H.G. & Eitinger, T. (2007). Allgemeine Mikrobiologie. Thieme-Verlag, Stuttgart.
- Garneau, J.E., & Moineau, S. (2011). Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microbial Cell Factories*, 10: 1-10.
- Gasson, M.J. (1983). Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *Journal of Bacteriology*, 154: 1-9.
- Gautier, M., Rouault, A., Méjean, S., Fauquant, J. & Maubois, J.L. (1994). Partition of *Lactococcus lactis* bacteriophage during the concentration of micellar casein by tangential 0.1 μ m pore size microfiltration. *Le Lait*, 74: 419-423.
- Geller, B.L., Ngo, H.T., Mooney, D.T., Su, P. & Dunn, N. (2005). Lactococcal 936-species phage attachment to surface of *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Science*, 88: 900-907.
- Gésan-Guiziou, G., Boyaval, E. & Daufin, G. (1999). Critical stability conditions in crossflow microfiltration of skimmed milk: transition to irreversible deposition. *Journal of Membrane Science*, 158: 211-222.
- Golshahi, L., Lynch, K.H., Dennis, J.J. & Finlay, W.H. (2010). *In vitro* lung delivery of bacteriophages KS4-M and Φ KZ using dry powder inhalers for treatment of

Burkholderia cepacia complex and *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Journal of Applied Microbiology*, 110: 106-117.

Grove, S.F., Lee, A., Lewis, T., Stewart, C.M., Chen, H. & Hoover, D.G. (2006). Inactivation of foodborne viruses of significance by high pressure and other processes. *Journal of Food Protection*, 69: 957-968.

Guglielmotti, D.M., Mercanti, D.J., Reinheimer, J.A. & Quiberoni, A. (2011). Review: efficiency of physical and chemical treatments on the inactivation of dairy bacteriophages. *Frontiers in Microbiology*, 2: 282.

Guglielmotti, D.M., Patrignani, F., Lanciotti, R., Guerzoni, M.E., Reinheimer, J.A. & Quiberoni, A. (2012). High pressure homogenization versus heat treatment: Effect on survival, growth, and metabolism of dairy *Leuconostoc* strains. *Journal of Food Protection*, 75: 1634-1641.

Hammer, P., Kiesner, C. & Walte, H.-G. (2014). *Short communication*: Effect of homogenization on heat inactivation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk. *Journal of Dairy Science*, 97: 1-4.

Hammer, P., Kiesner, C., Walte, H.-G., Knappstein, K. & Teufel, P. (2002). Heat resistance of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* in raw milk tested in a pilot plant pasteurizer. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 54: 275-303.

Heller, K.J. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 374–379.

Heller, K.J., Fieseler, L. & Loessner, M.J. (2011). Bakteriophagen - Grundlagen, Rolle in Lebensmitteln und Anwendungen zum Nachweis sowie der Kontrolle von Krankheitserregern. Behr's Verlag, Hamburg.

Hemme, D. & Foucaud-Scheunemann, C. (2004): *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*, 14: 467-494.

Hendrix, R.W. (2003). Bacteriophage genomics. *Current Opinion in Microbiology*, 6: 506-511.

Hinrichs, J. (2001). Incorporation of whey proteins in cheese. *International Dairy Journal*, 11: 495-503.

Holder, A., Scholz, S., Kulozik, U. & Hinrichs, J. (2013). Cross-flow electro membrane filtration: Theory and application in the dairy industry. *Chemie Ingenieur Technik*, 85: 1193-1200.

Holzappel, W. & Wood, B. (2012). The genera of lactic acid bacteria. Springer, US.

Housby, J.N. & Mann, N.H. (2009). Phage therapy. *Drug Discovery Today*, 14: 536-540.

- Hugenholtz, J., Perdon, L. & Abee, T. (1993). Growth and energy generation by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis during citrate metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 4216-4222.
- Huotari, H.M., Trägårdh, G. & Huisman, I.H. (1999). Crossflow membrane filtration enhanced by an external DC electric field: A review. *Chemical Engineering Research and Design*, 77: 461-468.
- Jang, S.H., Hwang, M.H. & Chang, H.I. (2010). Complete genome sequence of Φ MH1, a *Leuconostoc* temperate phage. *Archives of Virology*, 155: 1883-1885.
- James, D., Scott, S.M., Ali, Z. & O'Hare, W.T. (2005): Chemical sensors for electronic nose systems. *Microchimica Acta*, 149: 1-17.
- Jarvis, A.W. (1989). Bacteriophages of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 72: 3406-3428.
- Jarvis, A.W., Fitzgerald, G.F., Mata, M., Mercenier, A., Neve, H., Powell, I.B., Ronda, C., Saxelin, M. & Teuber, M. (1991). Species and type phages of lactococcal bacteriophages. *Intervirology*, 32: 2-9.
- Jelen, P. (2002). Whey processing. Utilization and products. In H. Roginski (Ed.), *Encyclopedia of dairy sciences* (pp. 2739-2745). Oxford, UK: Elsevier.
- Katzin, L.I., Sandholzer, L. & Strong, M.E. (1943). Application of the decimal reduction time principle to a study of the resistance of coliform bacteria to pasteurisation. *Journal of Bacteriology*, 3: 265-272.
- Kelly, S.T. & Zydney, A.L. (1997). Protein fouling during microfiltration: Comparative behavior of different model proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 55: 91-100.
- Kessler, H.G. (2002). *Food and bio process engineering - Dairy technology* (4. ed.). Munich, Germany: Publishing House A. Kessler.
- Kleiner, M., Hooper, L.V. & Duerkop, B.A. (2015). Evaluation of methods to purify virus-like particles for metagenomic sequencing of intestinal viromes. *BMC Genomics*, 16: 7. DOI 10.1186/s12864-014-1207-4
- Kot, W., Hammer, K., Neve, H. & Vogensen, F.K. (2013). Identification of the receptor-binding protein in lytic *Leuconostoc pseudomesenteroides* bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 79: 3311-3314.
- Kot, W., Hansen, L.H., Neve, H., Hammer, K., Jacobsen, S., Pedersen, P.D., Sørensen, S.J., Heller, K.J. & Vogensen, F.K. (2014a). Sequence and comparative analysis of *Leuconostoc* dairy bacteriophages. *International Journal of Food Microbiology*, 176: 29-37.
- Kot, W., Neve, H., Heller, K.J., Vogensen, F.K. (2014b). Bacteriophages of *Leuconostoc*, *Oenococcus*, and *Weissella*. *Frontiers in Microbiology*, 5: 186.

- Krusch, U., Neve, H., Luschei, B. & Teuber, B. (1987). Characterization of virulent bacteriophages of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* by host specificity and electron microscopy. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 39: 155-167.
- Kutateladze, M. & Adamia, R. (2010). Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in Biotechnology*, 28: 591-595.
- Lagrange, V., Whitsett, D. & Burris, C. (2015). Global market for dairy proteins. *Journal of Food Science*, 80: A16-A22.
- Lahtinen, S. (2012). Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. 4th ed. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Lawrence, R.C., Creamer, L.K. & Gilles, J. (1987). Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 70: 1748-1760.
- Le Marrec, C., van Sinderen, D., Walsh, L., Stanley, E., Vlegels, E., Moineau, S., Heinze, P., Fitzgerald, G. & Fayard, B. (1997). *Streptococcus thermophilus* bacteriophages can be divided into two distinct groups based on mode of packaging and structural protein composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3246-3253.
- Lepeuple, A.-S., Vassal, L., Cesselin, B., Delacroix-Buchet, A., Gripon, J.-C. & Chapot-Chartier, M.-P. (1998). Involvement of a prophage in the lysis of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2 during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 8: 667-674.
- Lo, C.G. & Bastian, E.D. (1998). Incorporation of native and denatured whey proteins into cheese curd for manufacture of reduced fat, Havarti-type cheese. *Journal of Dairy Science*, 81: 16-24.
- Loof, M., Lembke, J. & Teuber, M. (1983). Characterization of the genome of the *Streptococcus lactis* "subsp. diacetylactis" bacteriophage P008 wide-spread in german cheese factories. *Systematic and Applied Microbiology*, 4: 413-423.
- Lorenzen, P.C., Walte, H.-G. & Bosse, B. (2013). Development of a method for butter type differentiation by electronic nose technology. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 181: 690-693.
- Lu, T.K. & Koeris, M.S. (2011). The next generation of bacteriophage therapy. *Current Opinion in Microbiology*, 14: 524-531.
- Ly-Chatain, M.H., Durand, L., Rigobello, V., Vera, A. & Demarigny, Y. (2011): Direct quantitative detection and identification of lactococcal bacteriophages from milk and whey by real-time PCR: Application for the detection of lactococcal bacteriophages in goat's raw milk whey in France. *International Journal of Microbiology*, 2011: 594369.

- Lynch, D., Kelly, P.M., Jordan, K.N., Freyne, T. & Murphy, P.M. (2007). Heat sensitivity of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk under pilot plant pasteurisation conditions. *International Journal of Dairy Technology*, 60: 98-104.
- Madera, C., Monjardín, C. & Suárez, J.E. (2004). Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 7365-7371.
- Madigan, M.T. & Martinko, J.M. (2009): Brock Mikrobiologie. 11. Auflage, Pearson Verlag, München.
- Märtlbauer, E. & Becker, H. (2016): Milchkunde und Milchhygiene. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Mahony, J., Bottacini, F., van Sinderen, D. & Fitzgerald, G.F. (2014). Progress in lactic acid bacterial phage research. *Microbial Cell Factories*, 13.
- Mahony, J., Deveau, H., Mc Grath, S., Ventura, M., Canchaya, C., Moineau, S., Fitzgerald, G.F. & van Sinderen, D. (2006). Sequence and comparative genomic analysis of lactococcal bacteriophages jj50, 712 and P008: evolutionary insights into the 936 phage species. *FEMS Microbiology Letters*, 261: 253-261.
- Mahony, J., Kot, W., Murphy, J., Ainsworth, S., Neve, H., Hansen, L.H., Heller, K.J., Sørensen, S.J., Hammer, K., Cambillau, C., Vogensen, F.K. & van Sinderen D. (2013). Investigation of the relationship between lactococcal host cell wall polysaccharide genotype and 936 phage receptor binding protein phylogeny. *Applied and Environmental Microbiology*, 79: 4385-4392.
- Mahony, J., McAuliffe, O., Ross, R. P. & van Sinderen, D. (2011). Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Current Opinion in Biotechnology*, 22: 157-163.
- Mahony, J., McDonnell, B., Casey, E. & van Sinderen, D. (2016). Phage-host interactions of cheese-making lactic acid bacteria. *Annual Review of Food Science Technology*, 7: 267-285.
- Mahony, J., Murphy, J. & van Sinderen, D. (2012). Lactococcal 936-type phages and dairy fermentation problems: From detection to evolution and prevention. *Frontiers in Microbiology*, 3: 335.
- Mahony, J. & van Sinderen, D. (2014). Current taxonomy of phages infecting lactic acid bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 5: 7.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T. & Buck, L.B. (1999): Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, 96: 713-723.
- Marcó, M.B., Moineau, S. & Quiberoni, A. (2012). Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage*, 2: 149-158.

- Martens, J. (2003). Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows. *Oldenburg Wissenschaftsverlag GmbH*, München, Germany.
- Marvig, C.L., Aideh, B., Neve, H., Heller, K.J., Knøchel, S. & Vogensen, F. K. (2011). Heat tolerance of dairy lactococcal c2 phages. *International Dairy Journal*, 21: 556-560.
- Maubois, J.L. (2002). Membrane microfiltration: a tool for a new approach in dairy technology. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 57: 92-96.
- McDonald, W.L., O'Riley, K.J., Schroen, C.J. & Condron, R.J. (2005). Heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 1785-1789.
- McDonnell, B., Mahony, J., Neve, H., Hanemaaijer, L., Noben, J.-P., Kouwen, T. & van Sinderen, D. (2016). Identification and analysis of a novel group of bacteriophages infecting the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82: 5153-5165.
- McGrath, S., Fitzgerald, G.F. & van Sinderen, D. (2002): Identification and characterization of phage-resistance genes in temperate lactococcal bacteriophages. *Molecular Microbiology*, 43: 509-520.
- McGrath, S., Fitzgerald, G.F. & van Sinderen, D. (2007). Bacteriophages in dairy products: Pros and cons. *Biotechnology Journal*, 2: 450-455.
- McIntyre, K., Heap, H.A., Davey, G.P. & Limsowtin, G.K.Y. (1991). The distribution of lactococcal bacteriophage in the environment of a cheese manufacturing plant. *International Dairy Journal*, 1: 183-197.
- McKay, L.L. & Baldwin, K.A. (1990). Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 7: 3-14.
- McNair, K., Bailey, B.A. & Edwards, R.A. (2012). PHACTS, a computational approach to classifying the lifestyle of phages. *Bioinformatics*, 28: 614-618.
- McSweeney, P.L. (1997). The flavour of milk and dairy products: III. Cheese: taste. *International Journal of Dairy Technology*, 50: 123-128.
- Michen, B. & Graule, T. (2010). Isoelectric points of viruses. *Journal of Applied Microbiology*, 109: 388-397.
- Miklic, A. & Rogelj, I. (2003). Characterization of lactococcal bacteriophages isolated from Slovenian dairies. *International Journal of Food Science and Technology*, 38: 305-311.
- Mills, S., Griffin, C., O'Sullivan, O., Coffey, A., McAuliffe, O.E., Meijer, W.C., Serrano, L.M. & Ross, R.P. (2011). A new phage on the 'Mozzarella' block: Bacteriophage

- 5093 shares a low level of homology with other *Streptococcus thermophilus* phages. *International Dairy Journal*, 21: 963-969.
- Mistry, V.V. & Kosikowski, F.V. (1986). Influence of milk ultrafiltration on bacteriophages of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 69: 2577-2582.
- Moineau, S., Borkaev, M., Holler, B.J., Walker, S.A., Kondo, J.K., Vedamuthu, E.R. & Vandenberg, P.A. (1996). Isolation and characterization of lactococcal bacteriophages from cultured buttermilk plants in the United States. *Journal of Dairy Science*, 79: 2104-2111.
- Moineau, S. & Lévesque, C. (2005). Control of bacteriophages in industrial fermentations. In E. Kutter & A. Sulakvelidze (Ed.), In: *Bacteriophages: Biology and Applications* (pp. 285–296). Boca Raton, USA: CRC Press.
- Moldovan, R., Chapman-McQuiston, E. & Wu, X.L. (2007). On kinetics of phage adsorption. *Biophysical Journal*, 93: 303-315.
- Moroni, O., Jean, J., Autret, J. & Fliss, I. (2002). Inactivation of lactococcal bacteriophages in liquid media using dynamic high pressure. *International Dairy Journal*, 12: 907-913.
- Mourouzidis-Mourouzis, S. A. & Karabelas, A. J. (2006). Whey protein fouling of microfiltration ceramic membranes - Pressure effects. *Journal of Membrane Science*, 282: 124-132.
- Müller-Merbach, M., Rauscher, T. & Hinrichs, J. (2005). Inactivation of bacteriophages by thermal and high-pressure treatment. *International Dairy Journal*, 15: 777-784.
- Müller-Merbach, M., Neve, H. & Hinrichs, J. (2005). Kinetics of the thermal inactivation of the *Lactococcus lactis* bacteriophage P008. *Journal of Dairy Research*, 72: 281-286.
- Müller von Blumencron, M., Hamacher, E., Schneider-Häder, B., Wiech, H. & Wortelmann, T. (2015). Instrumentelle Sensorik in der Ernährungswirtschaft. *DLG-Expertenwissen*, 2.
- Murphy, J., Mahony, J., Bonestroo, M., Nauta, A. & van Sinderen, D. (2014). Impact of thermal and biocidal treatments on lactococcal 936-type phages. *International Dairy Journal*, 34: 56-61.
- Murphy, J., Royer, B., Mahony, J., Hoyles, L., Heller, K., Neve, H., Bonestroo, M., Nauta, A. & van Sinderen, D. (2013). Biodiversity of lactococcal bacteriophages isolated from 3 Gouda-type cheese-producing plants. *Journal of Dairy Science*, 96: 4945-4957.
- Neve, H. (1996). Bacteriophage. In T. M. Cogan & J. P. Accolas (Eds.), *Dairy Starter Cultures* (pp. 157-189): New York, NY, USA: VCH Publishers Inc.

- Neve, H., Berger, A. & Heller, K.J. (1995). A method for detecting and enumerating airborne virulent bacteriophage of dairy starter cultures. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 47: 193-207.
- Neve, H., Geis, A. & Teuber, M. (1984). Conjugal transfer and characterization of bacteriocin plasmids in group N (lactic) streptococci. *Journal of Bacteriology*, 157: 833-838.
- Neve, H., Zenz, K.I., Desiere, F., Koch, A., Heller, K.J. & Brüssow, H. (1998). Comparison of the lysogeny modules from the temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophages TP-J34 and Sfi21: implications for the modular theory of phage evolution. *Virology*, 241: 61-72.
- O'Sullivan, D., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. & Coffey, A. (2000). Investigation of the relationship between lysogeny and lysis of *Lactococcus lactis* in cheese using prophage-targeted PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2192-2198.
- Otto, R., de Vos, W.M. & Gavrieli, J. (1982). Plasmid DNA in *Streptococcus cremoris* Wg2: Influence of pH on selection in chemostats of a variant lacking a protease plasmid. *Applied and Environmental Microbiology*, 43: 1272-1277.
- Pandey, A., Bringel, F. & Meyer, J.-M. (1994). Iron requirement and search for siderophores in lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40: 735-739.
- Pearce, L.E., Truong, T.H., Crawford, R.A., Yates, G. F., Cavaignac, S. & de Lisle, G.W. (2001). Effect of turbulent-flow pasteurization on survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* added to raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 3964-3969.
- Peng, S., Hummerjohann, J., Stephan, R. & Hammer, P. (2013). Short communication: Heat resistance of *Escherichia coli* strains in raw milk at different subpasteurization conditions. *Journal of Dairy Science*, 96: 3543-3546.
- Piry, A., Heino, A., Kühnl, W., Grein, T., Ripperger, S. & Kulozik, U. (2012). Effect of membrane length, membrane resistance, and filtration conditions on the fractionation of milk proteins by microfiltration. *Journal of Dairy Science*, 95: 1590-1602.
- Piry, A., Kühnl, W., Grein, T., Tolkach, A., Ripperger, S. & Kulozik, U. (2008). Length dependency of flux and protein permeation in crossflow microfiltration of skimmed milk. *Journal of Membrane Science*, 325: 887-894.
- Poeggel, G. (2013). Kurzlehrbuch Biologie. 3., überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Pogacic, T., Maillard, M.-B., Leclerc, A., Herve, C., Chuat, V., Yee, A.L., Valence, F. & Thierry, A. (2015). A methodological approach to screen diverse cheese-related bacteria for their ability to produce aroma compounds. *Food Microbiology*, 46:145-153.

- Pouliot, Y. (2008). Membrane processes in dairy technology - From a simple idea to worldwide panacea. *International Dairy Journal*, 18: 735-740.
- Ptashne, M. (2004). A genetic switch. Phage lambda revisited. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Pujato, S.A., Guglielmotti, D.M., Ackermann, H.W., Patrignani, F., Lanciotti, R., Reinheimer, J.A. & Quiberoni, A. (2014). *Leuconostoc* bacteriophages from blue cheese manufacture: long-term survival, resistance to thermal treatments, high pressure homogenization and chemical biocides of industrial application. *International Journal of Food Microbiology*, 177: 81-88.
- Pujato, S.A., Mercanti, D.J., Guglielmotti, D.M., Rousseau, G.M., Moineau, S., Reinheimer J.A. & Quiberoni, A. (2015). Phages of dairy *Leuconostoc mesenteroides*: genomics and factors influencing their adsorption. *International Journal of Food Microbiology*, 18: 58-65.
- Quiberoni, A., Guglielmotti, D. M., & Reinheimer, J. A. (2003). Inactivation of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages by heat and biocides. *International Journal of Food Microbiology*, 84: 51-62.
- Quiberoni, A. & Reinheimer, J. A. (1998). Physicochemical characterization of phage adsorption to *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 cells. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 762-768.
- Quiberoni, A., Tremblay, D., Ackermann, H.-W., Moineau, S. & Reinheimer, J. A. (2006). Diversity of *Streptococcus thermophilus* phages in a large-production cheese factory in Argentina. *Journal of Dairy Science*, 89: 3791-3799.
- Rademaker, J.L.W., Meeuwisse, J. & Giffel, M. (2002). Heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, p.317-319. In R. A. Juste, M. V. Geijo, and J. M. Garrido (ed.), Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis. Madison, Wis.
- Rektor, A. & Vatai, G. (2004). Membrane filtration of mozzarella whey. *Desalination*, 162: 279-286.
- Rezaei, H., Ashtiani, F. Z. & Fouladitajar, A. (2011). Effects of operating parameters on fouling mechanism and membrane flux in cross-flow microfiltration of whey. *Desalination*, 274: 262-271.
- Riemelt, I., Bartel, B. & Malczan, M. (2007). *Milchwirtschaftliche Mikrobiologie*. Behr's Verlag, Hamburg.
- Rosenberg, M. (1995). Current and future applications for membrane processes in the dairy industry. *Trends in Food Science and Technology*, 6: 12-19.
- Saboya, L.V. & Maubois, J.-L. (2000). Current developments of microfiltration technology in the dairy industry. *Le Lait*, 80: 541-553.

- Salminen, S., Wright, A. v. & Ouwehand, A. (2004). Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. 3rd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker (Food science and technology, 139).
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samson, J.E. & Moineau, S. (2010). Characterization of *Lactococcus lactis* phage 949 and comparison with other lactococcal phages. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 6843-6852.
- Samtlebe, M., Neve, H., Heller, K.J., Hinrichs, J., Atamer, Z. (2012). *Leuconostoc* bacteriophages and their effects on the organoleptic properties of fermented milk products. *European Dairy Magazine*, 5: 20-23.
- Samtlebe, M., Wagner, N., Neve, H., Heller, K.J., Hinrichs, J. & Atamer, Z. (2015). Application of a membrane technology to remove bacteriophages from whey. *International Dairy Journal*, 48: 38-45.
- Samtlebe, M., Wagner, N., Neve, H., Heller, K.J., Hinrichs, J. & Atamer, Z. (2017). Reduction of *Lactococcus lactis* phage contamination in whey by means of membrane filtration: Impact of phage morphology and of bacterial host cells functioning as "phage fishing tool". *International Dairy Journal*, 68: 88-94.
- Schenkel, P., Samudrala, R. & Hinrichs, J. (2011). Fat-reduced semi-hard cheese enriched with a microparticulated whey protein concentrate: Impact on cheese-making properties and rheological characteristics. *Milchwissenschaft*, 66: 43-47.
- Schenkel, P., Samudrala, R. & Hinrichs, J. (2013). The effect of adding whey protein particles as inert filler on thermophysical properties of fat-reduced semihard cheese type Gouda. *International Journal of Dairy Technology*, 66: 220-230.
- Schmidt, V.S.J., Kaufmann, V., Kulozik, U., Scherer, S. & Wenning, M. (2012). Microbial biodiversity, quality and shelf life of microfiltered and pasteurized extended shelf life (ESL) milk from Germany, Austria and Switzerland. *International Journal of Food Microbiology*, 154: 1-9.
- Scholle, I. (2015). Vergleichende Untersuchungen zu den sensorischen Eigenschaften molkenproteinangereicherter Käse mittels humansensorischer und instrumenteller Analyseverfahren. Masterarbeit, *Max Rubner-Institut, Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch*.
- Schuck, P., Bouhallab, S., Durupt, D., Varelle, P., Humbert, J.P. & Marin, M. (2004). Spray drying of wheys and derivatives. *Lait*, 84: 243-268.
- Shin, C. (1983). Some characteristics of *Leuconostoc cremoris* bacteriophage isolated from blue cheese. *Japanese Journal of Zootechnical Science*, 54: 481-486.

- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. & Ohno, K. (2008). Effects of reversible and irreversible membrane fouling on virus removal by a coagulation–microfiltration system. *Journal of Water Supply: Research and Technology - Aqua*, 57: 501-506.
- Spinelli, S., Veessler, D., Bebeacua, C. & Cambillau, C. (2014). Structures and host-adhesion mechanisms of lactococcal siphophages. *Frontiers in Microbiology*, 5: 3.
- Staczek, J., Marino, A.A., Gilleland, L.B., Pizarro, A. & Harry Jr, E.G. (1998). Low-frequency electromagnetic fields alter the replication cycle of MS2 bacteriophage. *Current Microbiology*, 36: 298-301.
- Steinhauer, T., Kulozik, U. & Gebhardt, R. (2014). Structure of milk protein deposits formed by casein micelles and β -lactoglobulin during frontal microfiltration. *Journal of Membrane Science*, 468: 126-132.
- Steinhauer, T., Marx, M., Bogendörfer, K. & Kulozik, U. (2015a). Membrane fouling during ultra- and microfiltration of whey and whey proteins at different environmental conditions: The role of aggregated whey proteins as fouling initiators. *Journal of Membrane Science*, 489: 20-27.
- Steinhauer, T., Schwing, J., Krauß, S. & Kulozik, U. (2015b). Enhancement of ultrafiltration-performance and improvement of hygienic quality during the production of whey concentrates. *International Dairy Journal*, 45: 8-14.
- Stumbo, C.R. (1973). Thermobiology in food processing. New York: Academic Press.
- Suárez, V.B. & Reinheimer, J.A. (2002). Effectiveness of thermal treatments and biocides in the inactivation of Argentinian *Lactococcus lactis* phages. *Journal of Food Protection*, 65: 1756-1759.
- Sulakvelidze, A. & Kutter, E. (2005). Bacteriophage therapy in humans. In E. Kutter & A. Sulakvelidze (Eds.), *Bacteriophages Biology and Applications*. Taylor & Francis.
- Summers, W.C. (2001). Bacteriophage therapy. *Annual Review of Microbiology*, 55: 437-451.
- Tamime, A. Y. (2002) Microbiology of starter cultures. In R. K. Robinson (Ed.), *Dairy microbiology handbook*. (3rd ed.). (pp. 261-366). New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Tang, Z., Huang, X., Sabour, P.M., Chambers, J.R. & Wang, Q. (2015). Preparation and characterization of dry powder bacteriophage K for intestinal delivery through oral administration. *LWT – Food Science and Technology*, 60: 263-270.
- Taylor, M.J. & Goldberg, I.D. (1971). Growth and cultivation of the unusual generalized transducing *Bacillus* bacteriophage SP-15. *Applied Microbiology*, 22: 113-119.

- Terzaghi, B.E. & Sandine, W.E. (1981). Bacteriophage production following exposure of lactic streptococci to ultraviolet radiation. *Journal of General Microbiology*, 122: 305-311.
- Terzaghi, B.E. & Sandine, W.E. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Journal of Applied Microbiology*, 29: 807-813.
- Toro-Sierra, J., Schumann, J. & Kulozik, U. (2013). Impact of spray-drying conditions on the particle size of microparticulated whey protein fractions. *Dairy Science and Technology*, 93: 487-503.
- Toro-Sierra, J., Tolkach, A. & Kulozik, U. (2011). Fractionation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin from whey protein isolate using selective thermal aggregation, an optimized membrane separation procedure and resolubilization techniques at pilot plant scale. *Food and Bioprocess Technology*, 6: 1032-1043.
- Twort, F. W. (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet*, 186: 1241-1243.
- Urbach, G. (1997). The flavour of milk and dairy products: II. Cheese: contribution of volatile compounds. *International Journal of Dairy Technology*, 50: 79-89.
- Vandenheuvel, D., Lavigne, R. & Brüssow, H. (2015). Bacteriophage therapy: Advances in formulation strategies and human clinical trials. *Annual Review of Virology*, 2: 599-618.
- Vandenheuvel, D., Singh, A., Vandersteegen, K., Klumpp, J., Lavigne, R. & van den Mooter, G. (2013). Feasibility of spray drying bacteriophages into respirable powders to combat pulmonary bacterial infections. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 84: 578-582.
- Vedamuthu, E.R. (1994). The dairy *Leuconostoc*: Use in dairy products. *Journal of Dairy Science*, 77: 2725-2737.
- Wagner, N. (2012). Nachweis und Typisierung von Bakteriophagen der Milchsäurebakterien in Molkenpulver und Molkenpulverformulierungen. *Masterarbeit*, Max Rubner-Institut, Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Kiel.
- Wagner, N., Brinks, E., Samtlebe, M., Hinrichs, J., Atamer, Z., Kot, W., Franz, C. M. A. P., Neve, H. & Heller, K.J. (2017). Whey powders are a rich source and excellent storage matrix for dairy bacteriophages. *International Journal of Food Microbiology*, 241: 308-317.
- Wagner, N., Samtlebe, M., Franz, C. M. A. P., Neve, H., Heller, K.J., Hinrichs, J. & Atamer, Z. (2017). Dairy bacteriophages isolated from whey powder: thermal inactivation and kinetic characterization. *International Dairy Journal*, 68: 95-104.
- Walstra, P., Wouters, J.T.M. & Geurts, T.J. (2006). Dairy science and technology (2nd ed.). Boca Raton, FL; USA: CRC Press Taylor & Francis Group.

- Walter, M., Fiedler, C., Grassl, R., Biebl, M., Rachel, R., Hermo-Parrado, X.L., Llamas-Saiz, A.L., Seckler, R., Miller, S. & van Raaij, M. J. (2008). Structure of the receptor-binding protein of bacteriophage det7: a podoviral tail spike in a myovirus. *Journal of Virology*, 82: 2265-2273.
- Wang, I.-N., Smith, D.L. & Young, R. (2000). Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annual Reviews Microbiology*, 54: 799-825.
- Wang, I.-N. (2006). Lysis timing and bacteriophage fitness. *Genetics*, 172: 17-26.
- Watanabe, K. & Takesue, S. (1972). The requirement for calcium in infection with *Lactobacillus* phage. *Journal of General Virology*, 17: 19-30.
- Weber, H. (2010): Mikrobiologie der Lebensmittel / Grundlagen. 9. Auflage, Behr's Verlag, Hamburg.
- Wittmann, R. (2007). Vergleichende Studien zur Hitzeinaktivierung von *Listeria monocytogenes* und *Salmonella* Senftenberg in Milch. Dissertation an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel.
- Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L., Vaningelgem, F., Lefebvre, K., Pot, B., Swings, J. & De Vuyst, L. (2006). Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 487-495.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: TEM Aufnahmen der <i>L. lactis</i> Phagen P008 & P001.....	4
Abb. 1.2: Lytische und lysogene Vermehrung von Bakteriophagen..	6
Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Phagenfamilien <i>Myoviridae</i> (A), <i>Siphoviridae</i> (B) und <i>Podoviridae</i> (C) mit ihren Kopfstrukturen.....	7
Abb. 1.4: Klassifizierung der <i>L. lactis</i> Phagen.....	9
Abb. 1.5: Klassifizierung der <i>Ln. mesenteroides</i> und <i>Ln. pseudomesenteroides</i> Phagen	11
Abb. 2.1: Edelstahlröhrchen zur Phagenerhitzung.....	27
Abb. 2.2: TEM Aufnahmen der <i>L. lactis</i> Phagen isoliert aus Molkenpulverformulierungen und Molkenpulvern	31
Abb. 2.3: TEM Aufnahmen der <i>Leuconostos</i> (a) und <i>S. thermophilus</i> Phagen (b) isoliert aus Molkenpulverformulierungen und Molkenpulvern	32
Abb. 2.4: DNA-Restriktionsverdau der <i>L. lactis</i> Phagen isoliert aus Molkenpulverformulierungen und Molkenpulvern	33
Abb. 2.5: Inaktivierung der <i>L. lactis</i> Phagen nach Hitzebehandlung in Milch bei 80 °C.....	34
Abb. 2.6: Thermische Inaktivierung des <i>L. lactis</i> Phagen P956 in Milch (A) und Wasser (B)	37
Abb. 2.7: DNA-Restriktionsverdau der hitzeresistentesten Phagen aus Molkenpulver sowie die beiden Laktokokken Phagen P680 und P1532	38
Abb. 2.8: Lagerungsstabilität (48 Monate) der <i>L. lactis</i> Phagen aus unterschiedlichen Molkenpulverformulierungen und Molkenpulver.	39
Abb. 3.1: TEM Aufnahmen der Phagen P008 (a), P680 (b), P1532 (c) und P635 (d).	45
Abb. 3.2: Schematische Darstellung eines aufgebauten CsCl-Gradientes (a) und Aufnahme eines zentrifugierten CsCl-Gradienten mit der Phagenbande (b).....	47
Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Pilot-Pasteurierungsanlage.	47
Abb. 3.4: Pilot-Pasteurierungsanlage.	48
Abb. 3.5: Grafische Darstellung des <i>D</i> -Wertes	51
Abb. 3.6: Grafische Darstellung des <i>z</i> -Wertes	51
Abb. 3.7: Die Inaktivierungskurven der Phagen P008, P680, P1532 und P635 bei unterschiedlichen Temperaturen.....	52
Abb. 3.8: Inaktivierungskinetik der Phagen P008 (a), P680 (b), P1532 (c) und P635 (d) bei unterschiedlichen Temperaturen und Heißhaltezeiten.....	54
Abb. 3.9: Logarithmische Inaktivierungskurve des Phagen P008 bei 75 °C.	55
Abb. 3.10: Extrapolation der Inaktivierungsdaten der Phagen P008 und P635 auf höhere Temperaturen.	57
Abb. 4.1: REM-Probenteller.....	66
Abb. 4.2: A) Schematische Skizze der Labormembrananlage, B) Membranfiltrationsanlage	66
Abb. 4.3: Versuchsaufbau zur Phagenadsorptionsmessung an thermisch inaktivierte Bakterien...	67
Abb. 4.4: REM Aufnahmen der trennaktiven Oberflächen der unbenutzten 500 kDa- (A) 300 kDa- (B) und 100 kDa- (C) Membranen.....	68

Abb. 4.5: REM Aufnahmen der Trägerunterseiten der unbenutzten 500 kDa- (A) und der 100 kDa- (B) Membranen	69
Abb. 4.6: REM Aufnahmen (Querschnitt) einer unbenutzten 300 kDa-Membran.	69
Abb. 4.7: TEM Aufnahmen der aufgereinigten <i>L. lactis</i> Phagen für die Filtrationsversuche	70
Abb. 4.8: Bestimmung der <i>L. lactis</i> Phagentiter nach Aufkonzentrierung und Reinigung mittels CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation und nach Lagerung über ca. 22 Monate.	71
Abb. 4.9: TEM Aufnahmen des <i>L. lactis</i> Phagen P987 nach einer 22-monatigen Lagerung bei 4 °C.	72
Abb. 4.10: Log-Reduktion des Phagen P008 und Permeation der α -Lactalbumins und β -Lactoglobulins nach der Filtration mit einer 100 kDa-, 300 kDa- und 500 kDa-Membran	73
Abb. 4.11: Titerreduktion der Phagen mit unterschiedlicher Morphologie während der Filtration mit einer 500 kDa-Membran in Molke	74
Abb. 4.12: REM Aufnahmen (Querschnitt) einer unbenutzten (A) und einer 5x gebrauchten (B) 300 kDa-Membran.	75
Abb. 4.13: Adsorption der Phagen P008, P369, P680 und P897 an unbehandelte und an für 30, 60 und 120 min bei 63 °C erhitze Bakterien.....	76
Abb. 4.14: Adsorption der Phagen P008, P369, P680 und P897 an intakte und zermahlene Bakterien	77
Abb. 4.15: TEM Aufnahmen der Phagen P008, P680, P369 und P897 nach Adsorption an intakte, erhitze und zermahlene Bakterienzellen.	78
Abb. 4.16: Vergleich der P008-Phagenreduktion (A) und der Gesamtmolkenproteinpermeation (B) nach der Filtration mit einer 300 kDa- und 500 kDa-Membran in unterschiedlichen Medien	79
Abb. 4.17: Agarose-Gelelektrophorese der Phagen P008, KSY1, P369, P897 und P001.....	81
Abb. 4.18: Agarose-Gelelektrophorese infektiöser P008 Phagen.....	82
Abb. 5.1: TEM Aufnahme des <i>Ln. pseudomesenteroides</i> Phagen P793.	88
Abb. 5.2: (A) Elektronische Nase mit Probenmesskolben im Wasserbad und EDV-Auswertung; (B) Gummipfropfen mit einer Kanüle zur Entnahme des Messgases.	90
Abb. 5.3: PCA-Plot von verschiedenen Sauermilchansätzen.	94
Abb. 5.4: PCA-Plot zweier Sauermilchansätze mit <i>L. lactis</i> Stamm F7/2 und <i>Ln. pseudomesenteroides</i> Stamm BuMi2, gemessen über einen Zeitraum von 10 Stunden.....	95
Abb. 5.5: pH-Wert-Verlauf von Sauermilch-Ansätzen mit einer phageninfizierten und einer intakten <i>Leuconostoc</i> -Kultur, gemessen über einen Zeitraum von 10 Stunden.	95
Abb. 5.6: Keimzahlenentwicklung in zwei Sauermilchproben und der Phagentiter in einem Ansatz mit einer phageninfizierten Aromakultur.	96
Abb. 5.7: Entwicklung der Keimzahlen für <i>Ln. pseudomesenteroides</i> Stamm BuMi2 und <i>L. lactis</i> Kultur Flora™ C160 sowie der P793-Phagentiter während der Käsereifung über 6 Wochen.....	97
Abb. 5.8: PCA-Plots der Käseproben nach 1 Tag (A), 2 Wochen (B), 4 Wochen (C) und 6 Wochen (D) Reifezeit	99
Abb. 5.9: Anzahl positiver und negativer Antworten bei der sensorischen Prüfung (Dreieckstest) von Käse mit 34 Teilnehmern.	100

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Stämme	17
Tabelle 2.2: Verwendete Referenz-Bakteriophagen	17
Tabelle 2.3: Enzyme mit mehrfacher Verwendung.....	18
Tabelle 2.4: Verwendete Restriktionsenzyme	18
Tabelle 2.5: Allgemeine Lösungen und Puffer	19
Tabelle 2.6: Lösungen und Puffer zur Phagen-DNA Extraktion.....	19
Tabelle 2.7: Nährmedien für <i>L. lactis</i>	20
Tabelle 2.8: Nährmedien für <i>Leuconostoc</i>	21
Tabelle 2.9: Nährmedien für <i>S. thermophilus</i>	22
Tabelle 2.10: Lösungen und Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese.....	27
Tabelle 2.11: Charakteristika und Wirtsspektren der Phagen aus Molkerpulverproben	29
Tabelle 2.12: Thermische Inaktivierung der <i>L. lactis</i> Phagen bei unterschiedlichen Temperaturen und Heißhaltezeiten	35
Tabelle 3.1: Verwendeten Bakteriophagen und Bakterienstämme.....	44
Tabelle 3.2: Lösungen und Puffer zur Herstellung des CsCl-Gradienten.....	46
Tabelle 3.3: Inaktivierung des Phagen P008 bei 75 °C und verschiedenen Heißhaltezeiten.....	55
Tabelle 3.4: <i>D</i> - und <i>z</i> -Werte der <i>L. lactis</i> Phagen P008, P680, P1532 und P635	56
Tabelle 4.1: Taxonomie und morphologische Beschreibung der eingesetzten <i>L. lactis</i> Phagen. ..	64
Tabelle 5.1: Übersicht über die verwendeten Starterkulturenstämme in den Sauermilch- und Käse- Versuchsansätzen	89
Tabelle 5.2: MOS-Sensoren der PEN2	91

Anhang

Tabelle A1: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agar Agar hochrein	Merck, Darmstadt
Agarose	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ascorbinsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Beef-Extract	BD, Becton Dickinson, Sparks, USA
Calciumchlorid- Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Cäsiumchlorid (CsCl)	Biomol, Hamburg
Chloroform	Merck, Darmstadt
DIG labeled Control DNA	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
D-Glucose	Merck, Darmstadt
DNase	AppliChem GmbH, Darmstadt
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Eisessig / Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol unvergällt	Merck, Darmstadt
Ethanol vergällt	Walter-CMP GmbH, Kiel
Glycin	Merck, Darmstadt
Hexanucleotidgemisch	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Iodacetamid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Isopropanol (2-Propanol)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (di-)	Merck, Darmstadt
Klenow Enzym	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Lactose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Lithiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Difco, BD, Becton Dickinson, Sparks, USA
Methanol	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat($\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Na- β -Glycerophosphat	VWR, Leuven, Belgien
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Phenol	AppliChem GmbH, Darmstadt
PEG 6000	Serva, Heidelberg
Phytone-Peptone	BD, Becton Dickinson, Sparks,USA
Ringer-Tabletten	Merck, Darmstadt
RNAse	Serva, Heidelberg
Poly-Peptone	BD, Becton Dickinson, Sparks, USA
Saccharose	Merck, Darmstadt
Tri-Na-Citrat-Dihydrat	Fluka, Schweiz
Tris	Serva, Heidelberg
Tryptone-Peptone	BD, Becton Dickinson, Sparks, USA
Yeast-Extract	BD, Becton Dickinson, Sparks, USA

Tabelle A2: Verwendete Geräte und Materialien

Gerät	Model	Hersteller
Brutschränke (30 °C / 60 °C)	B12	Hereaus Instruments, Hanau
Deckelflasche	25 ml – 2 l	Schott AG, Mainz
Eismaschine	AF 100 AS, 230/50/1	Scotsman® Frimont S.p.A. Pogliano MIL
Elektrophorese-Kammer	Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad, München
Falkon-Röhrchen	Cellstar® Tubes, 50 ml	Greiner Bio One
Filterpapier	S&S Gel-Blotting-Papiere, 300 x 600 mm	Schleicher & Schuell, Dassel
Gasbrenner	Gasprofi 1 SCS	WLD-Tec GmbH, Göttingen
Glasglimmerplatte		Plano GmbH, Wetzlar
Kupfernetzchen	400-mesh	Plano GmbH, Wetzlar
Kryoröhrchen	Cryo Tube Vials	Nunc A/S, Dänemark
Lichtmikroskop	Axioskop 40	Zeiss, Jena
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging,	Chicago, USA
Petrischalen (steril)	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
PCR-Cycler	Thermocycler (5333 00744)	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	Mettler Toledo 340	Schertzenbach
Photometer	Nanocolor® 500 D	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Pipettenspitzen	Research 10, 100, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen (steril)	Dualfilter 10, 100, 1000 µl PCR Clean	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfen	Accu-jet pro	Brand GmbH, Wertheim
Power-Supply	Mini Power Pack P20	Biometra GmbH, Göttingen
Reaktionsgefäße	1,5 ml; 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Reinstwasseranlage	Reinstwassersystem Clean SG	Barsbüttel
REM	FEI XL30	FEI Company, Niederlande
Schüttler	Vortex Genie 2 TM Horizontalschüttler RO 30	Bender & Hobein AG, Zürich C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Hechingen
Seitenarmkolben	100 ml, 300 ml, 500 ml	Schott AG, Mainz
Spritzen	Syringe, 10 ml	Terumo
Sterilbank	ELB 2448	LAF-Technik, Hamburg
Sterilfilter Whatman	FP30 / 0,20 & 0,45 µm	Schleicher & Schüll, Dassel
Thermoblock	CHB-202	BIOER
Thermocycler	Mastercycler	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
TEM	Tecnai 10	FEI Company, Eindhoven, Niederlande
UV-Licht Fotokammer	Universal Hood II Kamera Chemi Doc™ XRS	Bio-Rad Laboratories GmbH, Mailand
Vortex Mixer	Vortex Genie 2™ Vortex Mixer	Scientific industries Inc., Boheia neo Lab, Heidelberg
Waage	AX2202	Sartorius, Göttingen
Wasserbäder	Julabo MC	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Zellmühle	FastPrep FP120	Bio 101 Savant Instruments Inc., Farm- ingdale (USA)
Zentrifugen	- Beckman Coulter J2-21 - Ultrazentrifuge Coulter Opti- ma™ L90K - 5417R, 5415C & 5415D	Beckman Coulter GmbH, Krefeld Beckman Coulter GmbH, Krefeld Eppendorf GmbH, Engelsdorf

	- Labofuge M	Heraeus Sepatech
Zentrifugenröhrchen	Polyallomer Centrifuge Tubes,	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifugenbecher	500 ml	Nalgene®

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Knut J. Heller für die stets hilfreiche und liebevolle Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Sie waren immer sehr geduldig und motivierend und haben mir durch Ihr umfangreiches Wissen immer weitergeholfen. Meinem Betreuer Dr. Horst Neve danke ich für seine Fürsorge und Vertrauen, die Du mir während der gesamten Zeit entgegengebracht hast. Du hattest stets eine Vorbildfunktion für mich und ich bin froh, dass Du immer ein offenes Ohr für mich hast. Ein großes Dankeschön richte ich an PD Dr. Charles M. A. P. Franz für Deine offene, freundliche und engagierte Art. Du hattest uns immer ein Gefühl der Zusammengehörigkeit vermittelt und warst immer bei allen großen und kleinen Problemen für uns da. Mein besonderer Dank gilt auch Sabrina Koberg (Schatz und La-La-Beauftragte), die nicht nur während der Arbeitszeit, sondern auch weit darüber hinaus zu einer sehr guten Freundin für mich geworden ist. Du hast stets gute Laune verbreitet und damit die Zeit im Labor sehr schön gemacht. Erik Brinks und Gregor Fiedler danke ich für die tolle Zeit und die „produktiven“ Kaffeepausen. Großes Dankeschön richte ich an Dr. Philipp Hammer und Dr. Hans-Georg Walte für die umfangreiche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche. Meiner Projektpartnerin und Freundin aus dem Süddeutschland Meike Samtlebe, sowie Prof. Dr. Jörg Hinrichs und Dr. Zeynep Atamer danke ich für die angenehme Zusammenarbeit. Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meinen lieben Kollegen für ihre Hilfsbereitschaft, das tolle Arbeitsklima und die familiäre Atmosphäre bedanken. Dies richtet sich insbesondere an Dr. Diana Habermann, Dr. Wilhelm Bockelmann, Dr. Christina Böhnlein, Dr. Gyu-Sung Cho, Dr. Bo Li, Michaela Steinke, Niels Rösch, Gisela Paasch, Frauke Repenning, Kirsten Gonda, Berenike Schröder und Britta Kaminski. Herzlichst danke ich auch Inka Lammertz, Angela Back, Petra Horn und Gesa Gehrke, die mich immer unterstützt haben und mittlerweile zu mehr als nur Kollegen für mich geworden sind. Dr. Jan Kabisch danke ich für die hilfreiche und geduldige Unterstützung in jeglichen Bereichen der Arbeit. Mein Dank gilt auch Tobias Großkopf, der mich in dem Wunsch zu promovieren immer bestärkt und ermutigt hat.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinem Freund, die mit Ihrer Liebe und Ihrer Geduld immer hinter mir standen und an mich geglaubt haben. Es macht mich glücklich zu wissen, dass ihr stolz auf mich seid!

Lebenslauf

Zur Person

Name, Vorname	Wagner, Natalia
Geburtsdatum	02.06.1985
Geburtsort	Gremutschaja Pad, Russland
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1991 - 1998	Gesamtschule, Russland
1998 - 2003	Christian-Hülsmeier-Realschule, Barnstorf
2003 - 2006	Fachgymnasium - Gesundheit und Soziales; Diepholz Abschluss: allgemeine Hochschulreife (Note 1,8)

Hochschulbildung

10/2006 - 10/2009	Ökotrophologie-Bachelorstudium Fachrichtung: Ernährungswissenschaft Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
10/2009 - 09/2012	Ökotrophologie-Masterstudium Fachrichtung: Ernährungswissenschaft Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Masterarbeit am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie (MBT), Max Rubner-Institut, Kiel
seit 10/2012	Promotion am MBT, Kiel

Beruflicher Werdegang

seit 02/2016	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Bereich „Bakteriophagen“ und „Darmmikrobiota“ am MBT, Kiel
--------------	---

Veröffentlichungen – internationale Zeitschriften

Samtlebe, M., Wagner, N., Neve, H., Heller, K.J., Hinrichs, J. & Atamer, Z. (2015). Application of membrane technology to remove bacteriophages from whey. *International Dairy Journal*, 48: 38-45.

Samtlebe, M., Ergin, F., Wagner, N., Neve, H., Küçükçetin, A., Franz, C. M. A. P., Heller, K.J., Hinrichs, J. & Atamer, Z. (2016). Carrier systems for bacteriophages to supplement food systems: Encapsulation and controlled release to modulate the human gut microbiota. *LWT - Food Science and Technology*, 68: 334-340.

Wagner, N., Brinks, E., Samtlebe, M., Hinrichs, J., Atamer, Z., Kot, W., Franz, C. M. A. P., Neve, H. & Heller, K.J. (2017). Whey powders are a rich source and excellent storage matrix for dairy bacteriophages. *International Journal of Food Microbiology*, 241: 308-317.

Wagner, N., Samtlebe, M., Franz, C. M. A. P., Neve, H., Heller, K.J., Hinrichs, J. & Atamer, Z. (2017). Dairy bacteriophages isolated from whey powder: thermal inactivation and kinetic characterization. *International Dairy Journal*, 68: 95-104.

Samtlebe, M., Wagner, N., Neve, H., Heller, K.J., Hinrichs, J. & Atamer, Z. (2017). Reduction of *Lactococcus lactis* phage contamination in whey by means of membrane filtration: Impact of phage morphology and of bacterial host cells functioning as "phage fishing tool". *International Dairy Journal*, 68: 88-94.

Samtlebe, M., Wagner, N., Brinks, E., Neve, H., Heller, K.J., Hinrichs, J. & Atamer, Z. (2017). Production of phage free cheese whey: Design of a tubular laboratory membrane filtration system and assessment of a feasibility study. *International Dairy Journal*, 71: 17-23.

Wagner, N., Matzen, S., Neve, H., Franz, C. M. A. P., Heller, K.J. & Hammer, P. (2017). Thermal stability of *Lactococcus lactis* bacteriophages: evaluation of phage inactivation in a pilot-plant pasteurizer. *LWT – Food Science and Technology*, under revision.

Veröffentlichungen – nationale Zeitschriften

Brinks, E., Samtlebe, M., Wagner, N., Neve, H., Heller, K. J., Hinrichs, J. & Atamer, Z., (2016). Nicht-thermische Phagenreduktion in Molke mittels Crossflow-Membranfiltration und molekulare Schnellnachweissysteme für extrem thermoresistente Phagen - Aktuelle Forschungsansätze zur Minimierung der Phagenbelastung in Molkereien. *DMW - Die Milchwirtschaft*, 7, 293-297.

Samtlebe, M., Rohrhirsch, F., Mesch, I., Wagner, N. & Hinrichs, J. (2016) Viruzide Wirkung von elektrolysiertem Wasser gegenüber Bakteriophagen. *DMW - Die Milchwirtschaft*, 12, 409-413.

Konferenzbeiträge

“Dissemination of dairy bacteriophages in whey powder samples“

Natalia Wagner, Horst Neve & Knut J. Heller

VAAM-Jahrestagung, 10.-13. März 2013, Bremen

“Contamination of whey powder samples with dairy bacteriophages”

Natalia Wagner, Horst Neve & Knut J. Heller

14. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie, 22.-24. April 2013, Tutzing

“Detection and characterization of dairy bacteriophages in whey powder samples”

Natalia Wagner, Horst Neve & Knut J. Heller.

Milchkonferenz, 16.-17. September 2013, Hohenheim, Stuttgart

“Assessment of the thermal stability of *Lactococcus lactis* bacteriophages in raw milk tested in a pilot plant pasteurizer”

Natalia Wagner, Philipp Hammer, Horst Neve & Knut J. Heller

3rd Kiel Food Science Symposium, 20.-21. Mai 2014, Kiel

“Thermal stability of *Lactococcus lactis* bacteriophages: evaluation of phage inactivation in a pilot plant pasteurizer”

Natalia Wagner, Philipp Hammer, Horst Neve & Knut J. Heller

11th International Symposium on Lactic Acid Bacteria, 31. August - 4. September 2014, Egmond aan Zee

„Molkenpulver - ein Reservoir für Phagen mit hoher Thermostabilität?“

Natalia Wagner, Meike Samtlebe, Jörg Hinrichs, Zeynep Atamer, Horst Neve, Charles MAP Franz & Knut Heller

15. *Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie*, 15. - 17. April 2015, Freising

„Phageninfektion einer *Leuconostoc* Kultur und deren Einfluss auf das Aromaprofil fermentierter Produkte“

Natalia Wagner, Hans-Georg Walte, Horst Neve, Knut Heller & Charles MAP Franz

16. *Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie*, 30. März - 1. April 2016, Hohenheim, Stuttgart

„Risikominimierung von Phageninfektionen“

Natalia Wagner, Meike Samtlebe, Erik Brinks, Charles M.A.P. Franz, Horst Neve, Knut J. Heller, Jörg Hinrichs, Zeynep Atamer

Milchtechnologisches Seminar 2017, 30.03.2017, Hohenheim, Stuttgart

„Molkenpulver – eine ergiebige Quelle für Bakteriophagen“

Natalia Wagner, Meike Samtlebe, Erik Brinks, Jörg Hinrichs, Knut J. Heller, Charles M.A.P. Franz, Horst Neve

17. *Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie 2017*, 03.-05. April, 2017, Landshut

“Biodiversity and long-term stability of dairy bacteriophages in whey powders”

Natalia Wagner, Erik Brinks, Meike Samtlebe, Jörg Hinrichs, Knut J. Heller, Charles M.A.P. Franz, Horst Neve

12th *International Symposium on Lactic Acid Bacteria*, 27.-31. August, 2017, Egmond aan Zee